

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
- Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer -

**Entwicklung eines potentiometrischen
Aflatoxin M₁-Immunosensors unter Verwendung von
3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure
als Elektronendonator**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärbiologischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Steffen Rameil
aus
Wiesbaden

München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer
Korreferent/en:	Priv.-Doz. Dr. Rinder

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

*Für meine Eltern
und
meine geliebte Ehefrau
Isabel Christin*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Aflatoxin M ₁ Entdeckung und Entstehung	3
2.2	Toxizität des Aflatoxin M ₁	5
2.3	Aflatoxin M ₁ -Nachweisverfahren	7
2.3.1	Aflatoxin M ₁ -Screening-Testsysteme	10
2.4	Biosensoren	10
2.4.1	Sensorplattform	13
2.4.2	Elektropolymerisation des Pyrrols	15
2.4.3	Potentiometrisches Messprinzip	18
3	Publikation	22
3.1	Use of 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid as electron donating compound in a potentiometric aflatoxin M ₁ -immunosensor	22
3.1.1	Abstract	22
3.1.2	Introduction	22
3.1.3	Experimental	24
3.1.3.1	Chemicals	24
3.1.3.2	Instrumental	24
3.1.3.3	Immuno-coating	24
3.1.3.4	Test procedure	25
3.1.3.5	Milk samples	25
3.1.3.6	Calculations	26
3.1.4	Results and discussion	26
3.1.4.1	Influence of the phenol's substituent and substituent's position on signal intensity	26
3.1.4.2	Influence of p-HPPA concentration on signal intensity	30
3.1.4.3	Influence of buffer system on signal intensity	31
3.1.4.4	Influence of pH on signal intensity	32
3.1.4.5	Comparison of p-HPPA to commercial HRP-substrates	33
3.1.4.6	Use of p-HPPA in the potentiometric aflatoxin M ₁ -immunosensor	35
3.1.4.7	Influence of different milk matrixes on the recovery of AFM ₁	36
3.1.5	References	38
4	Diskussion	40
5	Zusammenfassung	46
6	Summary	47
7	Literatur	48

Abkürzungsverzeichnis

AOAC	Association of Analytical Communities
CPG	Compliance Policy Guide
CSV	Comma-Separated Values
DC	Dünnschichtchromatographie
DIS	Draft International Standard
DON	Deoxynivalenol
EC	Enzyme Commission
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Enzymimmuntest
FDA	Food and Drug Association
GST	Glutathion-S-Transferase
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IAEA	International Atomic Energy Agency
IDF	International Dairy Federation
ISE	Ionenselektive Elektrode
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
m-HPPA	3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure
o-HPPA	3-(2-Hydroxyphenyl)-propionsäure
OPD	o-Phenylendiamin, 1,2-Diaminobenzol
PET	Polyethylenterephthalat
p-HPPA	3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Dodecylsulfat Natriumsalz
SPFS	Surface Plasmon-enhanced Fluorescence Spectroscopy, Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
USB	Universal Serial Bus

1 **Einleitung**

Bis heute kennt man mehr als 300 Mykotoxine, die von über 250 Schimmelpilzarten gebildet werden. Auslöser für die Mykotoxinbildung sind abiotische Faktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit, pH-Wert und Nährstoffangebot, wobei ungünstige Wachstumsbedingungen sogar zu einer kurzfristigen Stimulierung der Mykotoxin-Produktion führen können.

Toxinbildende Schimmelpilze gehören zur Mikroflora des Getreides und werden grundsätzlich in zwei Gruppen eingeteilt. Die sogenannten Feldpilze, repräsentiert durch Vertreter der Gattungen *Alternaria* und *Fusarium* u.a., infizieren verschiedene Getreidearten wie Mais, Weizen, Hafer und Gerste, aber auch andere pflanzliche Produkte bereits während der Vegetationsperiode auf dem Feld und produzieren dabei verschiedene Mykotoxine wie z.B. Alternariol bzw. Deoxynivalenol (DON). Die andere Gruppe, v.a. *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten, können pflanzliche Produkte zwar auch bereits auf dem Feld infizieren, eine massive Vermehrung und Toxinbildung (wie z.B. Aflatoxine) in größerem Umfang erfolgt allerdings erst bei einer unsachgemäßen Lagerung. Daher wird diese Gruppe auch als Lagerpilze bezeichnet, wobei feuchte und warme Bedingungen das Wachstum von Aflatoxin-produzierenden Aspergillen begünstigen. Deshalb tritt eine Aflatoxin-Kontamination von pflanzlichen Lebens- und Futtermitteln am häufigsten in subtropischen und tropischen Regionen auf. Regelmäßig sind hierbei Aflatoxin B₁, B₂, G₁ und G₂ zu finden. Insbesondere Aflatoxin B₁ stellt eine der stärksten karzinogenen Substanzen in Lebens- bzw. Futtermitteln dar und besitzt zusätzlich noch eine sehr hohe akute Toxizität. So führen bei einem Menschen schon geringe Mengen von Aflatoxin B₁ (10 µg/kg Körpergewicht) zu akuter Leberdystrophie.

Wenn Aflatoxine über die Nahrung aufgenommen werden, findet ein Übergang in die Milch von Säugetieren statt. Aflatoxin M₁, das über eine Hydroxylierung des Aflatoxin B₁ durch das Leberenzym Cytochrom P450 gebildet wird, stellt hierbei den Hauptmetaboliten dar, während andere Derivate und Konjugate nur eine untergeordnete Rolle spielen. Ebenso wie Aflatoxin B₁ besitzt auch Aflatoxin M₁ mutagene und kanzerogene Eigenschaften und weist ein hohes zytotoxisches Potential auf. Aufgrund dieser starken toxischen und hepatokarzinogenen Eigenschaften des Aflatoxins B₁ bzw. M₁ für Menschen und Tiere wurden

Grenzwerte im Lebens- und Futtermittelbereich festgesetzt. Der europäische Grenzwert für Aflatoxin M₁ in Kuhmilch liegt bei 50 ppt, in den USA liegt der Wert bei 500 ppt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf den Nachweis von Aflatoxin M₁ in Kuhmilch gelegt. Dass Milch ein weltweites Grundnahrungsmittel ist und auch einen bedeutenden Wirtschaftsfaktor darstellt belegen u.a. die Produktionszahlen. So lag die Weltmilcherzeugung in 2008 bei knapp 690 Millionen Tonnen. Die drei größten Milcherzeuger sind die Europäische Union mit 149 Millionen Tonnen, Indien mit 105 Millionen Tonnen und die USA produzierte 86 Millionen Tonnen im Jahr 2008. Innerhalb der Europäischen Union ist Deutschland mit rund 28 Millionen Tonnen der größte Milchproduzent und im weltweiten Ranking liegt es auf dem sechsten Platz. Die Qualitätskontrolle der Milch stellt bei solchen Mengen einen hohen Anspruch an die Analysemethoden in Bezug auf Analysenzeit und Analysenkosten. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, ein Screening-Testsystem zu entwickeln, mit dem sich eine schnelle, einfache und kostengünstige Analyse von Kuhmilch auf Aflatoxin M₁ durchführen lässt. Als Testplattform diene ein potentiometrischer Immunosensor, der eine Polypyrrol-Schicht als Transducer besitzt. Die Polypyrrol-Oberfläche wurde mit einem polyklonalen Anti-Aflatoxin M₁-Antikörper beschichtet und ein Aflatoxin B₁-Meerrettichperoxidase-Konjugat diene als markiertes Antigen. Neben der Testentwicklung wurde auch der Einfluss des Substratmediums, für die enzymatische Reaktion der Meerrettichperoxidase, auf die Signalstärke des Testsystems untersucht. Insbesondere der Einfluss des Elektronendonators auf die generierte Signalstärke stellte einen der Schwerpunkte dieser Arbeit dar.

2 **Schrifttum**

2.1 **Aflatoxin M₁ Entdeckung und Entstehung**

Aflatoxine sind Mykotoxine, die durch die Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* gebildet werden. Die beiden Spezies *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* sind hierbei die häufigsten Verursacher einer Aflatoxin B₁-Kontamination von Lebens- und Futtermitteln [GOURAMA et al., 1995]. Bei den Aflatoxinen handelt es sich um natürliche sekundäre Metabolit-Endprodukte, die beim Wachstum auf nährstoffreichen Substraten (z.B. Lebens- und Futtermittel) und erst nach Beendigung der Wachstumsphase gebildet werden [ROTH et al., 1990]. Hauptquellen für mit Aflatoxin kontaminierte Lebens- und Futtermittel sind tropische und subtropische Länder. Dass Aflatoxine aber auch in europäischen Ländern ein Problem darstellen, zeigten Fälle aus Italien und Polen, bei denen mit Aflatoxinen (25-40 µg/kg) kontaminierter Mais bzw. Maissilagen gefunden wurden [EC, 2004]. Hauptursachen für die Bildung von Aflatoxinen sind unsachgemäße Lagerung (z.B. zu hohe Luftfeuchtigkeit und warme Temperaturen), weshalb die Gattung *Aspergillus* auch als „Lagerpilz“ bezeichnet wird. In seltenen Fällen lassen sich diese auch bereits auf dem Feld finden. Unter bestimmten Bedingungen und Zusätzen wie z.B. Ameisensäure, welche als Konservierungsmittel für Silagen dient, können sich Aflatoxine auch in Silagen bilden [PETTERSSON et al., 1989].

Bekannt wurden die Aflatoxine als Verursacher des Truthahnsterbens (100 000 Tiere) 1960 in Großbritannien. Parallel dazu starben in den USA 1 000 000 junge Zuchtforellen. Die anschließenden Untersuchungen der verwendeten Futtermittel ergaben eine hohe Kontamination mit *A. flavus* und Difuranocumarinen. Die Difuranocumarine wurden in Anlehnung an den Gattungsnamen des Schimmelpilzes als Aflatoxine bezeichnet. Zusätzlich bekamen die Aflatoxine entsprechend ihrer Fluoreszenz unter langwelligem UV-Licht (360 nm) die Indizes G = Grün und B = Blau [ROTH et al., 1990]. Die Struktur der Aflatoxine setzt sich aus Dihydrofuran- bzw. Tetrahydrofuran-Ringen und einem substituierten Cumarin-System zusammen [RÖMPP , 1995]. Aufgrund dieses chemischen Aufbaus sind Aflatoxine sehr schlecht in polaren, aber dafür sehr gut in apolaren Lösungsmitteln löslich. Ein Überblick über die Strukturen der häufigsten Aflatoxine ist in Abb. 1 dargestellt.

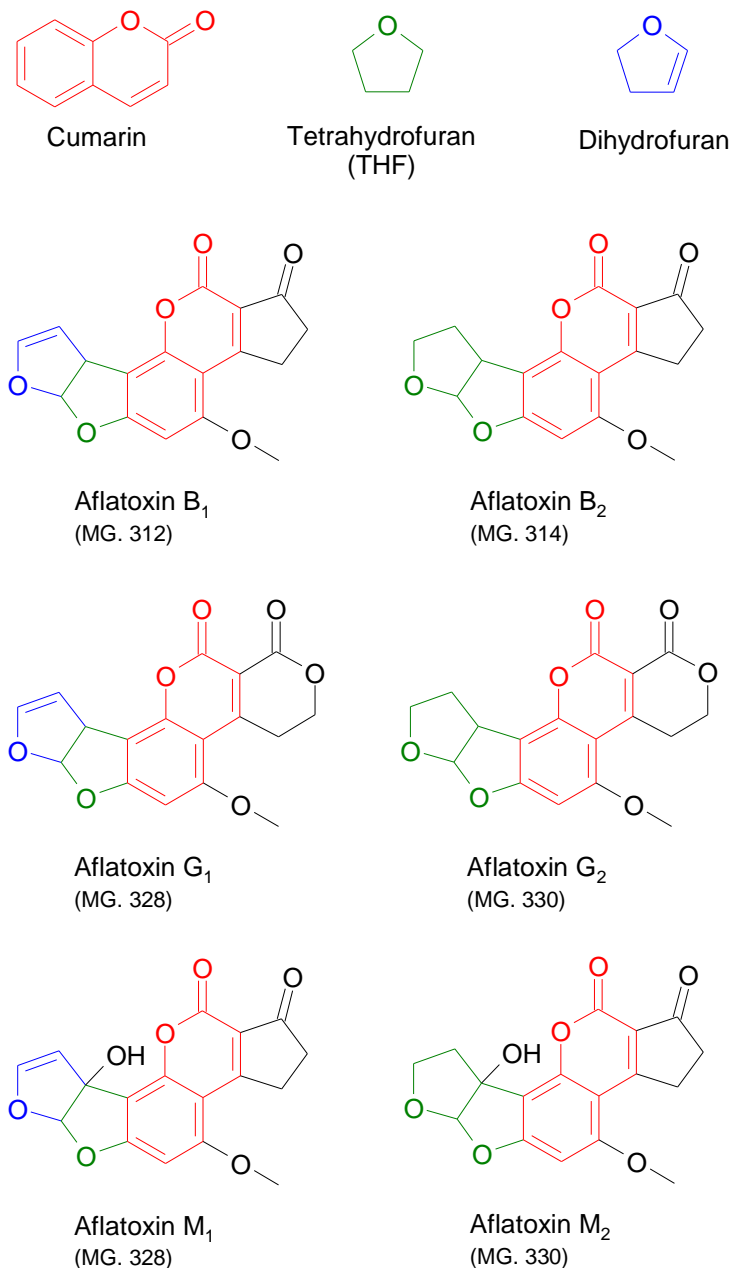


Abbildung 1: Molekülstrukturen und Bausteine von Aflatoxinen.

Aflatoxin M₁ wird über eine Hydroxylierungsreaktion durch das Leberenzym Cytochrom P450 aus Aflatoxin B₁ gebildet [GUENGERICH et al., 1998]. Diese Reaktion ist eine natürliche „Entgiftungsreaktion“, wenn über die Nahrung Aflatoxin B₁ aufgenommen wurde. Das gebildete Aflatoxin M₁ ist bei laktierenden Tieren (z.B. Milchkühen) und Menschen in der Milch nachweisbar [EL-NEZAMI et al., 1995; PETTERSSON, 2004; BATTACONE et al., 2003 und 2005; POLYCHRONAKI et al., 2006 und 2007; KESKIN et al., 2009].

Die mittlere Carry-over-Rate (Carry-over-Rate = Umwandlung von Aflatoxin B₁ im Futtermittel zu Aflatoxin M₁ in Milch) liegt bei „normalen“ Milchkühen bei 1 – 2%, wobei die Carry-over-Rate bei Hochleistungskühen auf ca. 2,7% [VAN EGMOND, 1989; PETTERSSON, 2004] bzw. bis auf 6,2% [VELDMANN et al., 1992] steigen kann. Die Ursachen hierfür sind wahrscheinlich eine Änderung in der Blut-Milch-Schranke, sowie Änderungen der Pansenflora durch die erhöhte Aufnahme von Kraftfuttermengen. Eine Carry-over-Rate von 6,2% würde trotz Einhaltung der gesetzlich vorgeschriebenen Grenzwerte für Aflatoxin B₁ im Futtermittel (EU 5 ppb bzw. USA 20 ppb) in einer Überschreitung des gesetzlichen Grenzwertes von Aflatoxin M₁ in Milch (EU 0,05 ppb bzw. USA 0,5 ppb) resultieren.

In Tab. 1 sind die US-amerikanischen (1 a) und europäischen (1 b) Grenzwerte für Aflatoxin B₁ und M₁ aufgeführt. Aktuelle Daten zur Aflatoxin M₁-Kontamination von Kuhmilch innerhalb der EU geben aber keinen Anlass zur Besorgnis [EC, 2004]. Auch die Aflatoxin M₁ Daten aus den USA geben keinen Anlass zur Besorgnis, denn obwohl hier der Futtermittelgrenzwert für Milchvieh mit 20 ppb vierfach höher ist als der europäische Grenzwert wird selbst der zehnfach niedrigere europäische Grenzwert von 0,05 ppb für Aflatoxin M₁ nur selten überschritten, ausgenommen im Süden und Süd-Westen der USA [JECFA, 2001].

2.2 Toxizität des Aflatoxins M₁

Dass Aflatoxine, insbesondere solche mit einem Dihydrofuranring, zu den potentesten genotoxischen und hepatokarzinogenen Substanzen zählen, liegt an der enzymatischen Umwandlung der Aflatoxine durch das Leberenzym Cytochrom P450 [ESSIGMANN et al., 1977; BUSBY et al., 1984; UENG et al., 1995 und 1998]. Bei dieser Umwandlung handelt es sich um eine Epoxidierungs-Reaktion bei der am Dihydrofuranring enzymatisch eine Epoxidgruppe gebildet wird (Abb. 2). Das entstandene Aflatoxin B₁ exo-8,9-Epoxid kann elektrophil mit dem N7-Atom eines Guaninrests der DNA reagieren [LYER et al., 1994; JOHNSON et al., 1996 und 1997], wodurch es Mutationen und Kanzerogenese auslösen kann. Eine Neutralisierung des Aflatoxin B₁ exo- 8,9-Epoxid erfolgt durch Hydrolyse oder über eine Konjugation mit Glutathion [JOHNSON et al., 1997, NEAL et al., 1983 und 1998, GUENGERICH et al., 1996 und 1998].

Tabelle 1: US-amerikanische (a) und europäische (b) Grenzwerte für Aflatoxine in Futtermitteln und Milch.

a) Quelle: Food and Drug Association (FDA)

Commodity	Action Level (ppb) ¹⁾	Reference
Corn and peanut products intended for finishing (i.e.; feedlot) beef cattle	300	CPG ²⁾ 683.100
Cottonseed meal intended for beef, cattle, swine, or poultry (regardless of age or breeding status)	300	
Corn and peanut products intended for finishing swine of 100 pounds or greater	200	
Corn and peanut products intended for breeding beef cattle, breeding swine, or mature poultry	100	
Corn, peanut products, and other animal feeds and feed ingredients but excluding cottonseed meal, intended for immature animals	20	
Corn, peanut products, cottonseed meal, and other animal feed ingredients intended for <u>dairy animals</u> , for animal species or uses not specified above, or when the intended use is unknown	20	CPG ²⁾ 527.400
Milk (Aflatoxin M1)	0,5	

¹⁾ppb = Parts per billion = 10^{-9} g/g; ²⁾ CPG = Compliance Policy Guide

b) Quelle: Richtlinie 2003/100/EG der Kommission i.V.m. Richtlinie 2002/32/EG des Europäischen Parlaments und des Rates bzw. Verordnung (EG) Nr.1881/2006 der Kommission

Bezeichnung:	Grenzwerte [ppb]
Alle Futtermittel-Ausgangserzeugnisse	20 ³⁾
Alleinfuttermittel für Rinder, Schafe und Ziegen, ausgenommen:	20 ³⁾
- Alleinfuttermittel für <u>Milchvieh</u>	5 ³⁾
- Alleinfuttermittel für Kälber und Lämmer	10 ³⁾
Alleinfuttermittel für Schweine und Geflügel (ausgenommen Jungtiere)	20 ³⁾
Andere Alleinfuttermittel	10 ³⁾
Ergänzungsfuttermittel für Rinder, Schafe und Ziegen (ausgenommen Ergänzungsfuttermittel für Milchvieh, Kälber und Lämmer)	20 ³⁾
Ergänzungsfuttermittel für Schweine und Geflügel (ausgenommen Jungtiere)	20 ³⁾
Andere Ergänzungsfuttermittel	5 ³⁾
Rohmilch, wärmebehandelte Milch und Werkmilch	0,05
Säuglingsnahrung und Folgenahrung, einschließlich Säuglingsmilchnahrung und Folgemilch	0,025 ⁴⁾

³⁾ Bezieht sich auf 88% Trockenmasse. ⁴⁾ Der Höchstgehalt bezieht sich auf das verzehrfertige Erzeugnis (als solches vermarktet oder in der vom Hersteller angegebenen Zubereitung).

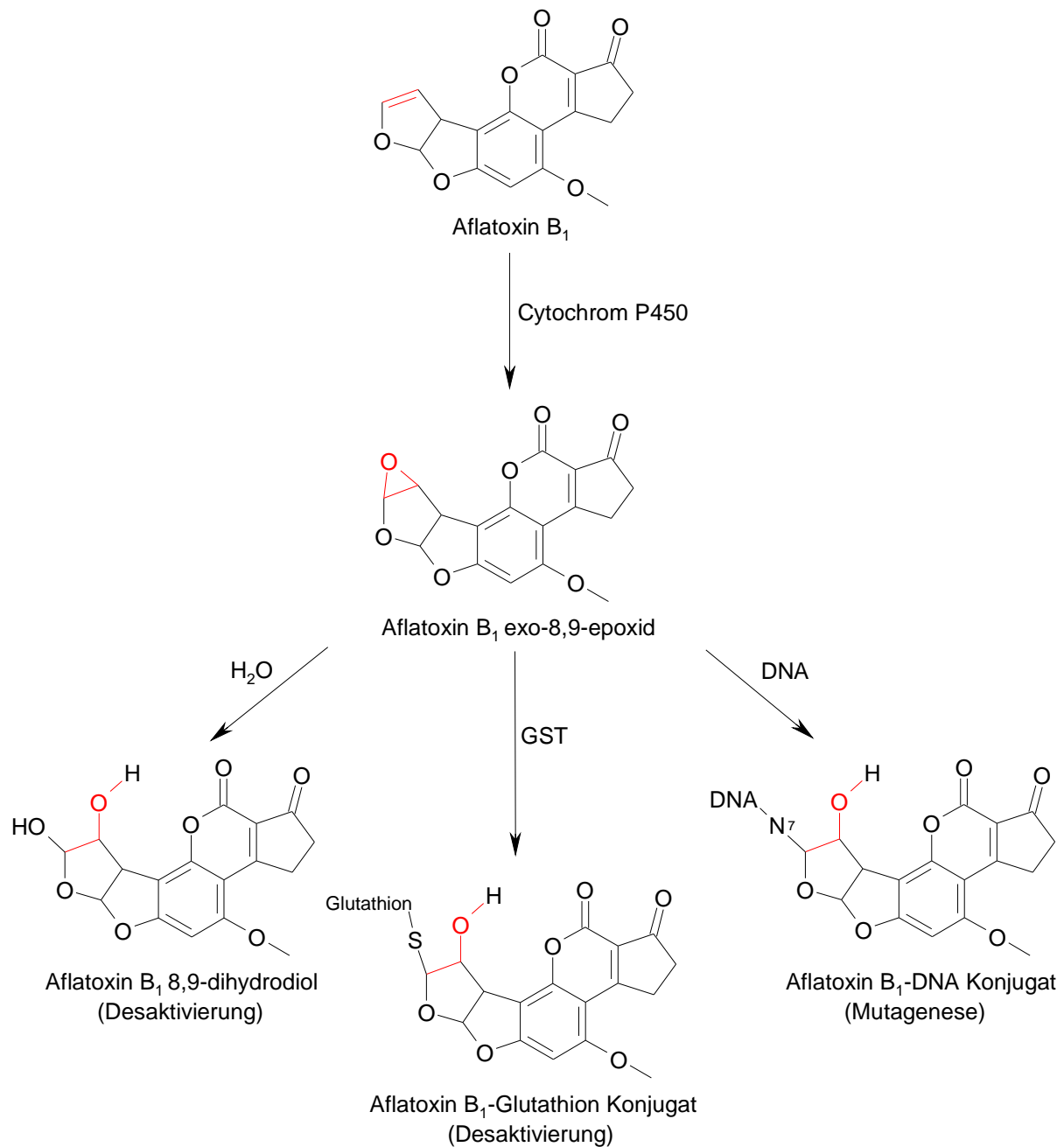


Abbildung 2: Epoxidbildung am Beispiel von Aflatoxin B₁ und dessen Reaktionswege (GST = Glutathion-S-Transferase, DNA = Desoxyribonukleinsäure; N7 = Stickstoffatomnummer 7 eines Guanins).

2.3 Aflatoxin M₁-Nachweisverfahren

Die ersten analytischen Aflatoxin M₁-Nachweisverfahren basierten auf der Dünnschichtchromatographie (DC) oder der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Beide Techniken, insbesondere die HPLC, eignen sich sehr gut zur quantitativen

Bestimmung von geringsten Analytkonzentrationen in einer Probe und haben sich in der chemischen Analytik bewährt. Aufgrund des Messprinzips stellen diese Methoden aber auch einen hohen Anspruch an die Probenaufarbeitung des zu untersuchenden Probenmaterials. Ziel der Probenaufarbeitung ist es, quantitativ den zu bestimmenden Analyten von der Probenmatrix zu trennen, so dass Matrixeinflüsse ausgeschlossen bzw. verringert werden und dadurch ein aussagekräftiges und reproduzierbares Ergebnis erzielt werden kann.

Da Milch eine sehr komplexe Probenmatrix darstellt, stellte die Entwicklung eines reproduzierbaren Nachweisverfahrens für Aflatoxin M₁ im ppt-Bereich für Jahrzehnte eine analytische Herausforderung dar. Für die Probenaufarbeitung wurden ursprünglich Extraktionslösungen aus Methanol und Wasser [JACOBSON et al., 1971] eingesetzt, ein Verfahren das dann nach weiteren Modifikationen durch McKinney [MCKINNEY, 1972] und Stubblefield [STUBBLEFIELD et al., 1974₁] letztendlich als offizielle AOAC- bzw. IUPAC- (International Union of Pure and Applied Chemistry) Methode anerkannt wurde [STUBBLEFIELD et al., 1974₂]. Zur Probenaufarbeitung wurden schlussendlich eine Proteinausfällung mit Essigsäure, eine Extraktionslösung bestehend aus einem Aceton/Wasser-Gemisch und ein Entfettungsschritt mittels Hexan eingesetzt. Die so aufgearbeitete Probe wurde dann dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die Konzentration fluorometrisch ermittelt. Eine weitere Probenaufarbeitung für die DC-Technik mit anschließender fluorometrischer Konzentrationsbestimmung verwendet Chloroform (Trichlormethan) als Extraktionslösung. Hierbei wird ein Gemisch aus Chloroform und Milchprobe in einen Scheidetrichter gegeben, wodurch sich das Aflatoxin M₁ in der apolaren Chloroformphase anreichert und der Großteil an wasserlöslichen Milchbestandteilen verbleibt in der polaren Milchphase. Anschließend wird der Aflatoxin M₁ enthaltende Probenanteil über eine Reinigungssäule (Kieselgel) aufgereinigt [STUBBLEFIELD, 1979]. Der Nachweis erfolgte dann mittels zweidimensionaler DC. Auch dieses Verfahren wurde als offizielle AOAC Methode (AOAC 980.21) anerkannt und erlaubte die quantitative Aflatoxin M₁-Bestimmung nicht nur in Milch (Nachweisgrenze für Rohmilch >0,02 ppb und für Milchpulver 1 ppb), sondern auch in Käse (Nachweisgrenze >0,3 ppb) [STUBBLEFIELD et al., 1980]. In den folgenden Jahren begann die HPLC-Technik immer stärker die DC-Technik in den analytischen Laboratorien zu verdrängen, so dass 1986 [STUBBLEFIELD et al., 1986] die AOAC

erstmals eine sensitive HPLC-Methode für die Bestimmung von Aflatoxin M₁ (Nachweisgrenze für Rohmilch 0,03 ppb) verabschiedete (AOAC 986.16).

Neben dem analytischen Fortschritt wurde auch die Probenaufarbeitung der Milch durch die Einführung von Immunaффinitätssäulen [DRAGACCI et al., 1995; CHEN et al., 2005] deutlich vereinfacht und verbessert. Durch diese Technologie kann sehr viel einfacher und effizienter quantitativ Aflatoxin M₁ aus der Milch isoliert werden. Bei dieser Methode läuft die Milchprobe durch eine Säule, an dessen Trägermaterial (z.B. Sepharose®) spezifische Anti-Aflatoxin M₁-Antikörper immobilisiert wurden. Diese binden spezifisch vorhandenes Aflatoxin M₁ aus der Milchprobe, welches nach Spülschritten durch geeignete Pufferwahl eluiert werden kann.

Die heute international anerkannten Analysemethoden der AOAC basieren auf der HPLC-Technik mit fluorometrischer Aflatoxin M₁-Quantifizierung (Nachweisgrenze für Rohmilch >0,02 ppb). Die AOAC 2000.08 Analysemethode [DRAGACCI et al., 2001] unterscheidet sich im Wesentlichen von der AOAC 986.16 Analysemethode darin, dass vor der HPLC das Aflatoxin M₁ mittels einer Immunaффinitätssäule angereichert wird, um es nach Derivatisierung mit Trifluoressigsäure fluorometrisch mittels HPLC nachzuweisen. Der Nachteil dieser Methoden ist der hohe Arbeits- und Zeitaufwand, sowie die hohen Material- und Gerätekosten. In einer Gemeinschaftsstudie der International Dairy Federation (IDF), der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) und der International Atomic Energy Agency (IAEA) wurde deshalb versucht eine kostengünstigere Analytik, insbesondere für die Laboratorien in Entwicklungsländern, zu finden. Das Ergebnis der Gemeinschaftsstudie [GROSSO et al., 2004] ist die offizielle Standardmethode ISO/DIS 14674 (Nachweisgrenze für Rohmilch 0,1 ppb). Diese Methode verwendet für die Probenaufarbeitung, wie die AOAC 2000.08 Analysemethode, eine Immunaффinitätssäule aber anstelle der HPLC die preiswerte DC-Technik für den Nachweis des Aflatoxin M₁. Trotz der kostengünstigeren DC-Technik, bleiben diese Methoden immer noch sehr arbeits- und zeitintensiv, weshalb sie überwiegend als Referenzmethoden und zur Verifizierung positiver Screening-Testergebnisse herangezogen werden.

2.3.1 Aflatoxin M₁-Screening-Testsysteme

Die Anzahl der heute verfügbaren Screening-Testsysteme für die Lebensmittelkontrolle ist kaum noch zu überschauen. Die bekanntesten kommerziellen Hersteller von Aflatoxin M₁-Tests sind Charm Sciences Inc. (USA), Idexx Laboratories Inc. (USA) und R-Biopharm AG (Deutschland). Der Anspruch an Screening-Testsysteme und die damit verbundenen Vorteile gegenüber den zuvor beschriebenen Methoden sind, dass sie einfach, sensitiv, preiswert und schnell durchzuführen sind, aber dennoch zuverlässige Messergebnisse generieren. Dass diese Attribute auf die meisten kommerziellen Screening-Testsysteme zutreffen, wird in Studien immer wieder bestätigt [SCOTT, 1989; RODRIGUEZ et al., 2003; SALTER et al., 2006]. Neben den kommerziellen Testsystemen findet man in der Literatur weitere Testmethoden für den Nachweis von Aflatoxin M₁. Beispiele hierfür sind ein Flow-Through-Test in Kombination mit einer Immunaффinitätssäule [SIBANDA et al., 1999], diverse ELISA-Formate [THIRUMALA-DEVI et al., 2002; MAGLIULO et al., 2005; RADOI et al., 2008] und Immunosensoren [MICHELI et al., 2005; PARKER et al., 2009₁ und 2009₂; WANG et al., 2009].

Jedes der kommerziellen wie auch nichtkommerziellen Aflatoxin M₁-Screening-Testsysteme beruht auf der immunologischen Erkennung des Analyten durch spezifische monoklonale bzw. polyklonale Antikörper. Damit stellt die Gewinnung von Anti-Aflatoxin M₁-Antikörpern die essentielle Grundlage dieser Screeningtests dar. Trotz dieser Tatsache sind geeignete und kommerziell erhältlich monoklonale bzw. polyklonale Anti-Aflatoxin M₁-Antikörper rar. Auch die Zahl der Veröffentlichungen, die sich mit der Herstellung von Anti-Aflatoxin M₁-Antikörpern beschäftigen, ist vergleichsweise gering [HARDER et al., 1979; WOYCHIK et al., 1984; GROOPMAN et al., 1984; MÄRTLBAUER et al., 1985; JI et al., 1992; DIETRICH et al., 1995; LI et al., 2000].

2.4 Biosensoren

Ein Biosensor ist ein Messsystem, bestehend aus einem biologischen Rezeptor (z.B. Antikörper) und einem Transducer, die aufgrund ihrer räumlichen Nähe

miteinander in Wechselwirkung treten können. Bindet am biologischen Rezeptor der Analyt wird ein Messsignal erzeugt (z.B. enzymatisch), das durch den Transducer in ein quantifizierbares elektrisches Signal umgewandelt wird. Dieses wird durch spezielle Apparaturen verstärkt und in ein quantitatives Messergebnis umgewandelt. In Abb. 3 ist dieser Aufbau schematisch dargestellt. Mittlerweile wurde eine Vielzahl verschiedenster Arten von Sensoren bzw. Biosensoren beschrieben, die sich nach den zugrundeliegenden Messprinzipien in verschiedene Gruppen einteilen lassen. Ein Überblick zu bislang publizierten analytischen Biosensor-Verfahren ist bei [LIGLER et al., 2008], [POHANKA et al., 2008], [GRIESHABER et al., 2008], [RASOOLY et al., 2009], [VISWANATHAN et al., 2009] und [RONKAINEN et al., 2010] zu finden.

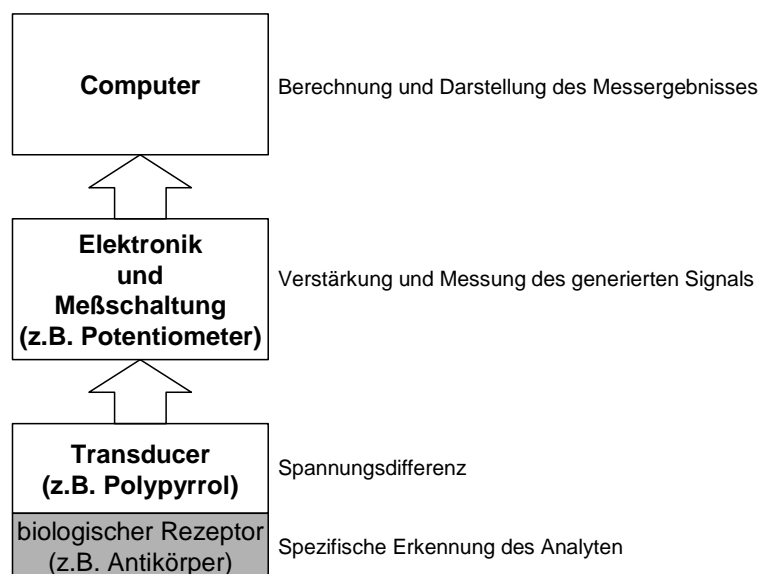


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Biosensors.

Elektrochemische Sensoren

Das Messsignal wird durch Amperometrie oder Potentiometrie generiert. Messtechnisch wird bei der amperometrischen Methode der Stromfluß (Ampere) zwischen zwei Elektroden bei konstanter Spannung (Volt) gemessen. Bei der potentiometrischen Methode wird hingegen die Potentialänderung (Volt) zwischen einer Referenzelektrode (z.B. Ag/AgCl) und einer Messelektrode (z.B. Polypyrrol) gemessen.

Optische Sensoren

Hier wird enzymatisch, physikalisch oder chemisch ein optisches Signal (z.B. Lumineszenz, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz) erzeugt, das dann durch eine Photozelle detektiert und in ein Messsignal umgewandelt werden kann.

Massenempfindliche Sensoren

Massenempfindliche Sensoren sind im Prinzip Waagen, die auf kleinste Massenänderungen mit einem messbaren elektrischen Signal reagieren. Die bekanntesten Sensoren dieser Bauart beruhen auf dem piezoelektrischen Effekt. Hierbei wird das Prinzip genutzt, dass die Schwingung eines Quarzes umgekehrt proportional zu seiner Masse ist. Bindet ein Analyt über einen Rezeptor an die Oberfläche des Quarzes, so erfolgt eine Frequenzänderung der Quarzschwingung, welche das Messsignal darstellt.

Anhand der geschilderten Eigenschaften und Messprinzipien eines Biosensors ist es nicht offensichtlich, weshalb die Biosensortechnologie Vorteile gegenüber den bisherigen Analysemethoden wie z.B. ELISA- oder der Lateral-Flow-Technik in der Lebensmittelanalytik haben sollte. Denn auch Biosensoren benötigen, wie ein ELISA- oder Lateral Flow-Test, spezifische Rezeptoren (z.B. Antikörper) für die Analyterkennung und häufig auch markierte Enzym-Konjugate o.ä. für die Erzeugung des Messsignals.

Die Vorteile der Biosensortechnik gegenüber den konventionellen Screening-Testsystemen liegen darin, dass das generierte Messsignal durch elektronische Apparaturen einfach und effektiv verstärkt werden kann. Des Weiteren bietet der Biosensoraufbau die Möglichkeit, auf kleinster Fläche gleichzeitig mehrere Parameter zu detektieren, so genannte Multiparameter-Tests. Auch werden durch die Miniaturisierung der Verbrauch von teuren Reagenzien und Materialien auf ein Minimum reduziert.

Trotz dieser Vorteile gibt es bis heute keinen kommerziellen Biosensortest für die Mykotoxin-Lebensmittelanalytik. Hauptgrund hierfür sind die immer noch zu hohen Herstellungskosten, insbesondere Materialkosten, für einen Biosensortest. Dass die

Biosensortechnik längst den Status der Produktfähigkeit erreicht hat, zeigen die Biosensorprodukte in der klinischen Diagnostik (z.B. der Blutzuckertest ACCU-CHECK[®], Roche).

Dass die Realisierbarkeit eines Aflatoxin M₁-Immunosensors gegeben ist, belegen die Veröffentlichungen zu diesem Thema [MICHELI et al., 2005; PARKER et al., 2009₁ und 2009₂; WANG et al., 2009]. Jeder dieser Immunosensorsysteme zeichnet sich mit einer Nachweisgrenze aus, die unter 50 ppt Aflatoxin M₁ in Milch liegt und damit für den Nachweis des US-amerikanischen als auch europäischen Grenzwerts für Aflatoxin M₁ geeignet wären. Charakteristika dieser Immunosensoren sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Auswahl von bereits beschriebenen Aflatoxin M₁-Immunosensoren.

Referenz	Messverfahren/ Testprinzip	Testzeit [min]	Nachweis- grenze [ppt]	Mess- bereich [ppt]	Anmerkungen
MICHELI et al., 2005	Chronoamperometrie/ direkt-kompetitiv	75	25	30 - 160	- Testdurchführung bei RT - TMB als HRP-Substrat
PARKER et al., 2009 ₁	Chronoamperometrie/ direkt-kompetitiv	125	8	10 - 100	- Testdurchführung bei 37 °C - Probenaufarbeitung notwendig - TMB als HRP-Substrat
PARKER et al., 2009 ₂	Chronoamperometrie/ direkt-kompetitiv	140	39	k.A. - 1000	- Testdurchführung bei 37 °C - Probenaufarbeitung notwendig - TMB als HRP-Substrat
WANG et al., 2009	Oberflächenplasmonen- Fluoreszenz- spektroskopie (SPFS)/ Inhibierungsformat	53	0,6	k.A. - 1800	- Testdurchführung bei RT - Probenaufarbeitung notwendig - Cy5 markierter Anti-Aflatoxin M ₁ -Antikörper

2.4.1 Sensorplattform

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Biosensor handelt es sich um einen potentiometrischen Biosensor der Firma Sensortec (Ickleton, England). Der Biosensor wird im Dickschichtverfahren (Siebdruck) hergestellt und als Substrat dient eine Polyethylenterephthalat-Folie. Die Dickschichttechnik ist eine sehr kostengünstige und etablierte Methode, um Strukturen auf Oberflächen aufzutragen.

Hierbei wird mit einem Rakel die Siebdruckpaste durch ein Sieb gedrückt. Dieser Vorgang erzeugt ein Druckbild auf dem Substrat, das die gleichen Konturen wie die offene Siebfläche zeigt. Hinter dem Rakel springt das Sieb, bedingt durch die Siebspannung, sofort wieder von der Substratoberfläche ab und die Siebdruckpaste haftet auf dem Substrat (Abb. 4). Dieser Vorgang wird für jede Strukturkomponente des Biosensors durchgeführt. Die Reihenfolge der Siebdruckschichten für die Referenz- und Messelektrode ist in Abb. 5 dargestellt.

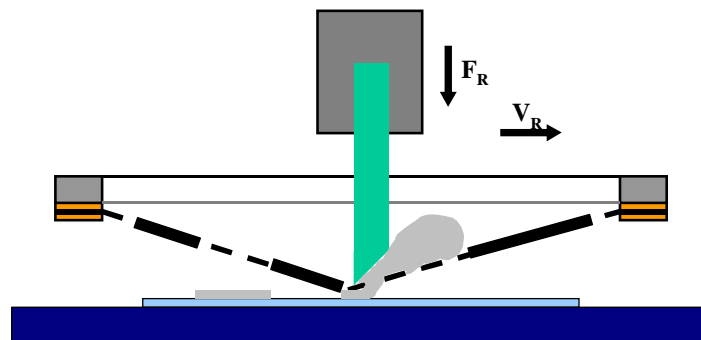


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Siebdruckprinzips für die Herstellung von Dickschichtsensoren. Der Rakel (grün) drückt mit der Kraft F_R das Sieb (schwarz) auf das Substrat (hellblau) und gleichzeitig die Paste (grau) mit der Geschwindigkeit V_R in horizontaler Richtung durch das Sieb. Hierdurch bleibt die Paste, nur an den offenen Siebstellen, auf dem Substrat haften.

Nach dem Siebdruck wird die Messelektrode des Biosensors elektrochemisch mit dem Halbleiterpolymer beschichtet. Hierbei wird auf der Messelektrode monomeres Pyrrol elektrisch zu Polypyrrol polymerisiert. Zusätzlich zum Pyrrol wird noch eine aliphatische Sulfonsäure [z.B. Sodiumdodecylsulfat (SDS)] dem Polymerisationsansatz zugesetzt. Die Dotierung mit einem anionischen Detergenz kompensiert die partiellen positiven Ladungen innerhalb des Polymers, die durch die elektrische Polymerisation entstehen. Des Weiteren lassen sich über die Art und Weise der Dotierung die physikalischen Eigenschaften, wie z.B. Leitfähigkeit und Hydrophobizität bzw. Hydrophilität, des Polypyrrols modifizieren.

Referenzelektrode



Ag/AgCl / Polypyrrol

Isolator

Karbon

Leiterbahn

PET

Messelektrode



Abbildung 5: Schematische Darstellung der einzelnen Siebdruckschichten des in der Arbeit verwendeten Biosensors (PET = Polyethylenterephthalat).

2.4.2 Elektropolymerisation des Pyrrols

Die Elektropolymerisation von monomeren Pyrrol durch Anlegen eines ausreichenden Oxidationspotentials an eine Arbeitselektrode wurde ursprünglich von Diaz [DIAZ et al., 1979] durchgeführt und beschrieben. Der „Diaz-Mechanismus“ für die Elektropolymerisation von Pyrrol ist in Abb. 6 dargestellt [GENIES et al., 1983; FUNT et al., 1991; WALTMAN et al., 1986; SADKI et al., 2000]. Initiiert wird die radikalische Polymerisation durch ein ausreichend hohes Oxidationspotential an der Arbeitselektrode (Anode), wodurch monomeres Pyrrol an der Elektrodenoberfläche zu Radikalkationen oxidiert wird (A). Das Pyrrol-Radikalkation zeigt in den mesomeren Grenzstrukturen sowohl in der α -Position als auch in der β -Position das ungepaarte Elektron. Die höchste ungepaarte Elektronendichte befindet sich aber in der α -Position [POPLE et al., 1970; WALTMAN et al., 1984], wodurch sich bevorzugt Pyrroldimere aus einer α, α' -Bindung (2,2'-Bindung) bilden, die sich durch die Abspaltung von zwei Protonen stabilisieren (B). Das gebildete Pyrroldimer (2,2'-Bipyrrol) wird ebenfalls zu einem Radikalkation oxidiert und bildet eine weitere α -Verknüpfung (5',2''-Bindung) mit einem weiteren Pyrrolradikalkation aus (C). Die Erweiterung des aromatischen Ringsystems durch den zunehmenden Polymerisationsgrad (D) des Polypyrrols hat zur Folge, dass das Oxidationspotential des Polypyrrols unter dem des monomeren Pyrrols sinkt. Gleichzeitig nimmt dadurch aber auch die Reaktivität des Radikalkations mit steigendem Polymerisationsgrad ab. Diese veränderten Moleküleigenschaften des Polypyrrols zum monomeren Pyrrol bedingen, dass neben den dominierenden α -Verknüpfungen (D.1) nun auch β -Verknüpfungen (D.2) entstehen können und sich hierdurch Verzweigungen in der Polymerstruktur [SCHMEISSER et al., 1993] ausbilden.

Das auf der Arbeitselektrode abgeschiedene Polypyrrol dient letztendlich als Transducer (Signalwandler). Der Transducer hat die Aufgabe, ein enzymatisch generiertes Signal in ein potentiometrisches Signal umzuwandeln. Die Transformierung des biochemischen Signals erfolgt durch die Wechselwirkung zwischen den enzymatisch gebildeten Reaktionsprodukten und dem konjugierten π -Elektronensystem des Polypyrrols. Durch die ausgeprägte Überlappung benachbarter π -Orbitale, innerhalb einer unverzweigten Polymerkette, entstehen Bänder aus bindenden und antibindenden Molekülorbitalen, die durch eine definierte Bandlücke voneinander getrennt werden. Hierbei unterscheidet man zwischen dem breiten Band von besetzten Zuständen (Valenzband), das aus den höchsten besetzten Molekülorbitalen gebildet wird (HOMO = Highest Occupied Molecular Orbital), und einem Band von unbesetzten Zuständen (Leitungsband), welches aus den niedrigsten unbesetzten Molekülorbitalen gebildet wird (LUMO = Lowest Unoccupied Molecular Orbital) [KUZMANY et al., 1985]. In undotierter Form verhält sich ein solches Polymer wie ein anorganischer Halbleiter (z.B. Silizium), welcher seine isolierende Eigenschaft mit zunehmendem Dotierungsgrad verliert, bis er in einen metallisch leitenden Zustand überführt ist. Aufgrund dieser Eigenschaften zählt das Polypyrrol auch zu den intrinsisch halb- bzw. leitfähigen Polymeren. Neben dem Polypyrrol gibt es noch eine Vielzahl von intrinsisch halb- bzw. leitfähigen Polymeren wie z.B. cis-Polyacetylen, trans-Polyacetylen, Polyphenylen, Polyanilin und Polythiophene. Im Gegensatz hierzu, gibt es noch die extrinsisch bzw. gefüllten leitfähigen Polymere. Diesen an sich nicht leitenden Polymeren werden Additive wie Ruß, Kohlenstoff-Fasern, Stahlfasern oder Aluminiumplättchen zugesetzt und erst hierdurch leitfähig gemacht.

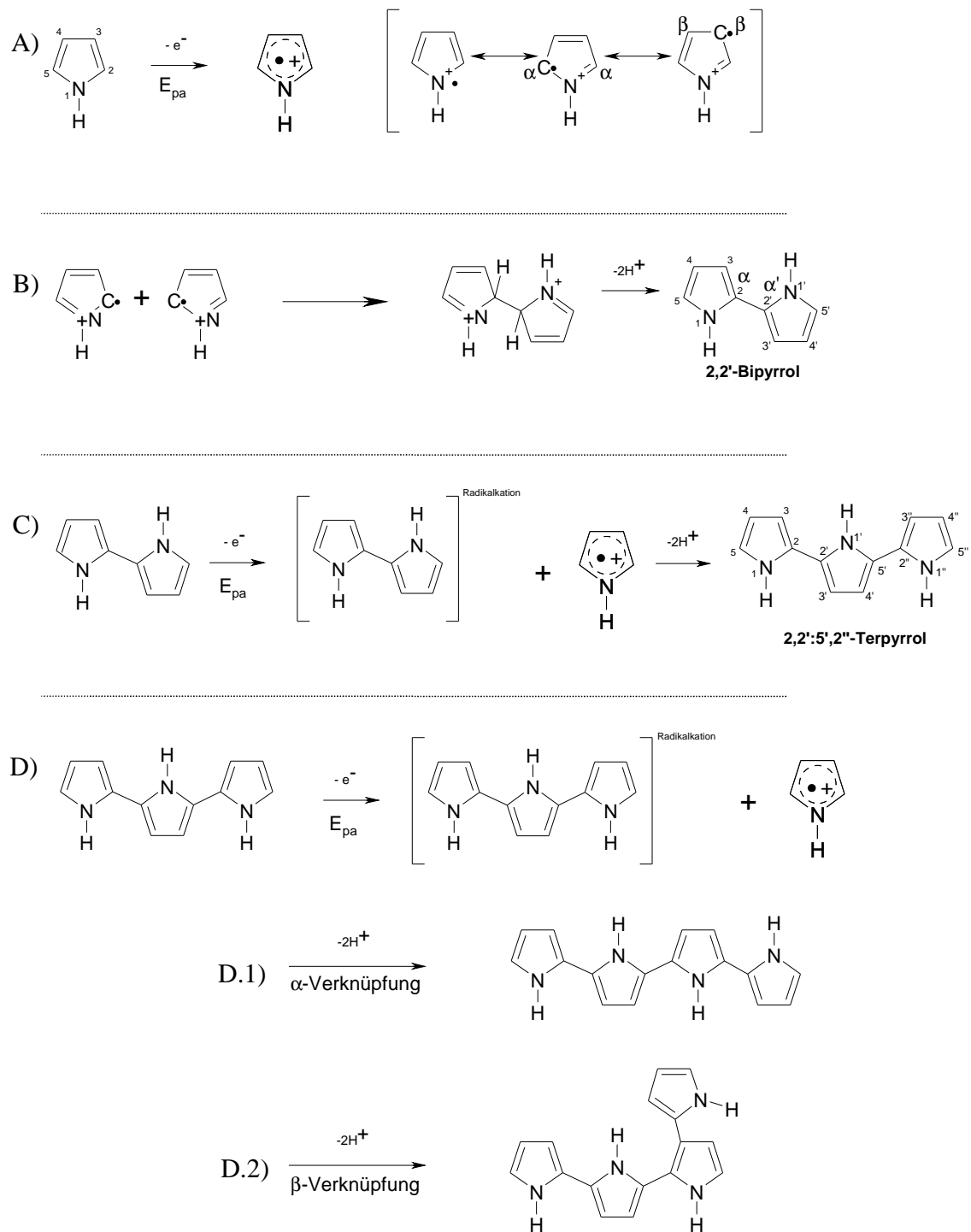


Abbildung 6: Darstellung des „Diaz-Mechanismus“, der die Elektropolymerisation des Pyrrols beschreibt.

2.4.3 Potentiometrisches Messprinzip

Die ersten auf dem potentiometrischen Messprinzip basierenden Biosensoren waren Enzymelektroden. Sie bestanden aus einer ionenselektiven Elektrode (ISE), die mit einer Enzymschicht versehen war. Die Reaktionsprodukte der enzymatischen Reaktion wurden dann durch die ISE detektiert. Einer der ältesten und bekanntesten dieser potentiometrischen Biosensoren ist der Harnstoffsensor [GUILBAULT et al., 1969]. Bei diesem Sensor wurde das Enzym Urease in einer Hydrogelschicht aus Polyacrylamid fixiert und durch ein Nylonnetz gestützt auf eine Glaselektrode (pH-Elektrode) aufgebracht. Taucht man die so modifizierte Glaselektrode in eine harnstoffhaltige Flüssigkeit ein, so diffundiert der Harnstoff ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) in die Gelschicht und wird dort durch die Urease enzymatisch zu Ammonium (NH_4^+) und Carbonat (CO_3^{2-}) abgebaut (Abb. 7).

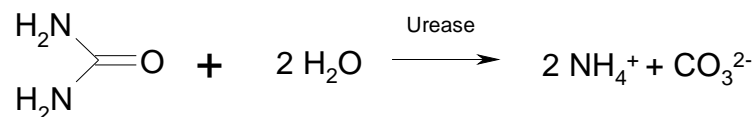


Abbildung 7: Urease-katalysierte Hydrolysereaktion von Harnstoff im wässrigen Medium.

Die beiden Edukte Ammonium und Carbonat bedingen eine Veränderung des Ausgangs-pH-Werts, welche die pH-Elektrode in Form einer Potentialänderung messen kann. Durch diesen Zusammenhang lässt sich einer gemessenen Potentialänderung eine definierte Harnstoffkonzentration zuordnen. Damit ein solches Signal reproduzierbar und stabil ist, muss sich bei einem potentiometrischen Enzymsensor eine stationäre Konzentration des gebildeten Reaktionsproduktes an der Elektrodenoberfläche ausbilden. Die Zeit, bis sich eine solche stationäre Konzentration des Reaktionsproduktes ausgebildet hat, wird als Einstellzeit bezeichnet und beträgt gewöhnlich einige Minuten. Die Einstellzeit ist der Zeitpunkt an dem bei einer enzymatischen Reaktion (z.B. Hydrolysereaktion der Urease), die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit mit dem Antransport des Analyten (z.B. Harnstoff) durch Diffusion im Gleichgewicht steht. In dieser stationären Phase sind die maximalen Konzentrationen des Reaktionsproduktes (z.B. Ammonium und Carbonat bei der Urease-Hydrolysereaktion) an der Elektrodenoberfläche zu finden [VADGAMA, 1990]. Der Zusammenhang zwischen enzymatischer

Reaktionsgeschwindigkeit, Analytkonzentration und Reaktionsproduktkonzentration ist in Abb. 8 zusammenfassend dargestellt.

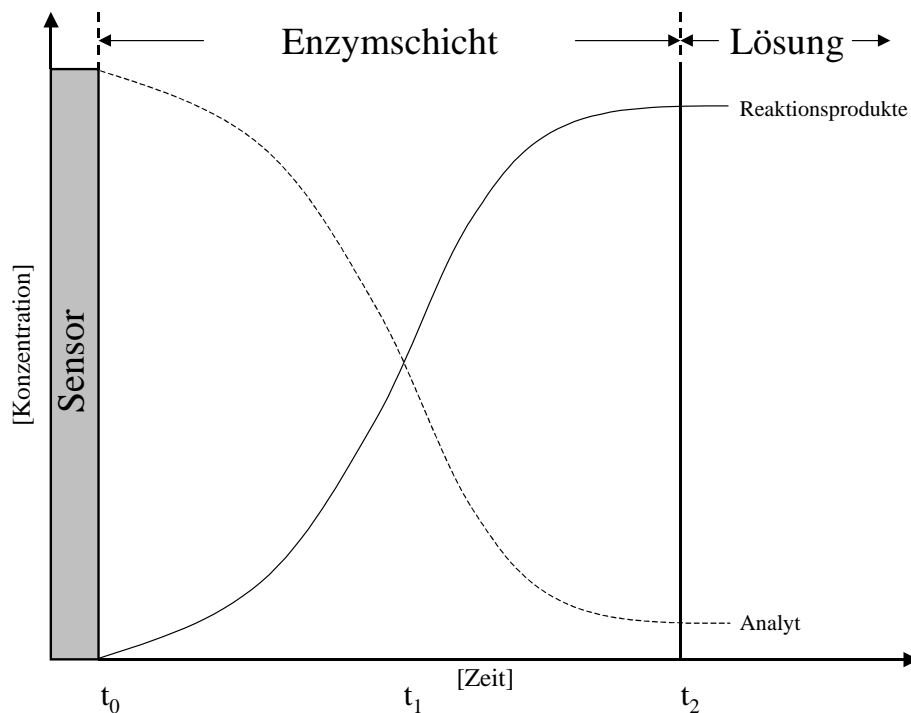


Abbildung 8: Dargestellt ist die Entstehung der stationären Phase bei einem potentiometrischen Biosensor. Am Zeitpunkt t_0 ist die Analytkonzentration maximal und die Reaktionsproduktkonzentration in der Enzymschicht Null. Unter diesen Startbedingungen ist die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit am schnellsten innerhalb des betrachteten Systems (wenn keine Substratinhibition vorliegt). Dies äußert sich durch einen schnellen Anstieg des Messsignals (nicht dargestellt). Am Zeitpunkt t_1 sind die Konzentrationen von Analyt und Reaktionsprodukt genau gleich und bei t_2 ist die Konzentration des Reaktionsprodukts an der Sensoroberfläche maximal. Die stationäre Phase des Systems ist damit erreicht, da sich jetzt das System im Gleichgewicht befindet. Das Gleichgewicht wird durch die Diffusionsgeschwindigkeit des Analyten aus der Lösung in die Enzymschicht und durch die Diffusionsgeschwindigkeit des Reaktionsprodukts aus der Enzymschicht in die Lösung gebildet. (Abbildung abgeändert nach [GRÜNDLER, 2004]).

Die meisten der heutigen potentiometrischen Biosensoren arbeiten immer noch nach dem Prinzip des oben beschriebenen Urease-Biosensors, d.h. sie basieren auf enzymatisch-erzeugten Reaktionsprodukten, durch die das Elektrodenpotential der Messelektrode verändert wird. Hauptunterschied ist lediglich, dass die biologischen Erkennungseinheiten (z.B. Antikörper, Enzym, DNA, etc.) nicht mehr in Hydrogele eingebettet werden, sondern absorbtiv oder kovalent an die oder in die Oberfläche der Messelektrode gebracht werden.

Apparativ ist ein potentiometrischer Biosensor ebenfalls immer gleich aufgebaut (Abb. 9). Hierzu zählt eine Referenz- bzw. Bezugselektrode (z.B. eine Ag/AgCl-Elektrode) mit einem konstanten Gleichgewichtspotential, das sich schnell und reproduzierbar einstellt. Diese ist über einen elektrischen Leiter (z.B. Kupferkabel) mit einem hochohmigen Potentiometer verbunden, welches als Messgerät dient, und dieses wiederum ist über einen elektrischen Leiter (z.B. Kupferkabel) mit einer Messelektrode (z.B. mit Polypyrrol) verbunden. Geschlossen wird der Stromkreis durch einen Ionenleiter (Elektrolyten) in den die beiden Elektroden eingetaucht werden.

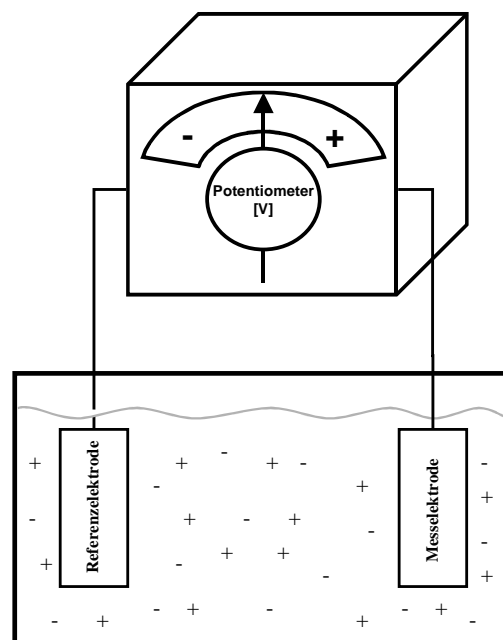


Abbildung 9: Apparativer Aufbau der Messeinheit eines potentiometrischen Biosensors. Die positiven und negativen Zeichen stellen den Ionenleiter (Elektrolyten) dar, in den die beiden Elektroden eingetaucht sind. Nicht dargestellt sind die biologischen Erkennungseinheiten an der Messelektrode, um den Analyten zu detektieren.

Das in dieser Arbeit verwendete Potentiometer ist ein eigens von Sensortec entwickelter Prototyp (Abb. 10). Es handelt sich hierbei um ein computergestütztes Potentiometer, welches über ein USB-Kabel mit einem Computer verbunden wird. Das Potentiometer verfügt über 12 Messkanäle, so dass simultan bis zu 12 Einzelmessungen durchgeführt werden können. Mittels einer speziellen

Steuerungssoftware (UTS Version 1.2) lassen sich Messparameter wie z.B. Ausgangspotential oder Messzeit einstellen. Die Messdaten werden als CSV-Datei gespeichert und können somit leicht in ein anderes Dateiformat konvertiert werden.

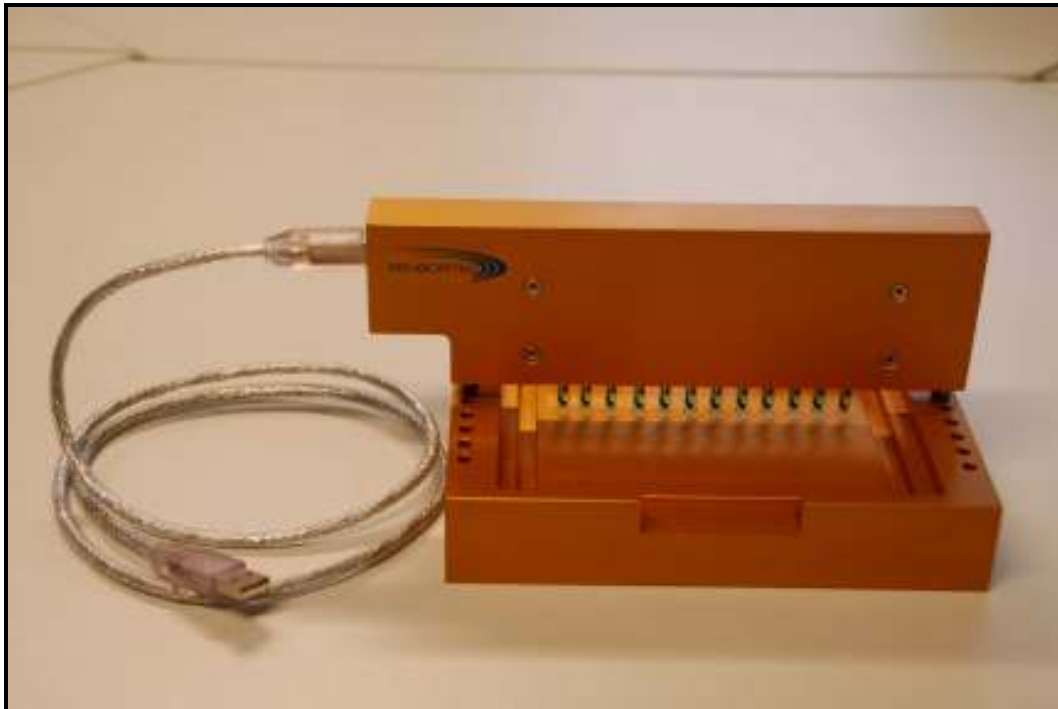


Abbildung 10: Computergestütztes Potentiometer von Sensortec für die Messung der Biosensoren.

3 Publikation

3.1 Use of 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid as electron donating compound in a potentiometric aflatoxin M₁-immunosensor

3.1.1 Abstract

We developed a potentiometric aflatoxin M₁-immunosensor which utilizes 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (p-HPPA) as electron donating compound for horse-radish peroxidase (HRP; EC 1.11.1.7). The assay system consists of a polypyrrole-surface-working electrode coated with a polyclonal anti-M₁ antibody (pAb-AFM₁), a Ag/AgCl reference electrode and a HRP-aflatoxin B₁ conjugate (HRP-AFB₁ conjugate).

To optimize the potentiometric measuring system p-HPPA as well as related compounds serving as electron donating compounds were compared. Also the influence of different buffer systems, varying pH and substrate concentration on signal intensity was investigated. Our results suggest that reaction conditions that favor the formation of Pummerer's type ketones lead to an increase in signal intensity rather than formation of fluorescent dye. Comparison with commercial ready-to-use HRP electron donating compounds such as 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), o-phenylenediamine (OPD) or 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) showed that only 34%, 77% and 49% of the signal intensity of p-HPPA were reached, respectively.

The optimized assay had a detection limit of 40 pg mL⁻¹ and allowed detection of 500 pg mL⁻¹ (FDA action limit) aflatoxin M₁ (AFM₁) in pasteurized milk and UHT-milk containing 0.3%-3.8% fat within 10 min without any sample treatment. The working range was between 250 and 2000 pg mL⁻¹ AFM₁.

3.1.2 Introduction

Contamination of cereals with aflatoxins is a serious problem in agriculture and human nutrition. Aflatoxin B₁ (AFB₁) is one of the strongest naturally occurring carcinogenic substances, which is mainly produced by the species *Aspergillus flavus*

and *Aspergillus parasiticus* [1]. If contaminated animal feed is fed to cows, AFB₁ is converted to aflatoxin M₁ (AFM₁) by the liver enzyme cytochrom P450 and excreted with the milk [2]. Since AFM₁ shows only slightly reduced toxicity and carcinogenicity compared to AFB₁, numerous countries set up maximum residue levels for milk. Currently two different limits for contamination of milk (0.05 µg kg⁻¹ and 0.5 µg kg⁻¹) are applied in the European Union and the United States, respectively.

Most routine and official methods for AFM₁ are based on high performance liquid chromatography (HPLC) techniques which are time consuming and require extensive sample preparations and clean-up steps involving the use of toxic solvents. Therefore simple, inexpensive and reliable immunochemical screening methods are desired by industry and governmental institutions. After the publication of the first enzyme immunoassays for the detection of AFM₁ more than 25 years ago [3-5], there was a continuous research focus on new immunochemical assays for AFM₁ [6-10]. Astonishingly, approaches to develop immunosensors for the detection of AFM₁ are still scarce [11]. Particularly among electrochemical techniques, which offer high sensitivity, low cost and the possibility of instrument miniaturization, only amperometric [12, 13] immunosensors have been described so far.

In this paper we describe a cheap and simple to use potentiometric immunosensor utilizing electrodes produced by screen printing and report for the first time the use of 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (p-HPPA) for generating a potentiometric readout with horse-radish peroxidase (HRP; EC 1.11.1.7), probably due to formation of Pummerer's type ketones rather than formation of fluorescent dye. p-HPPA has the advantage of low toxicity and generates a higher signal than most other commercial substrates. The working electrode's surface was electrochemically furnished with polypyrrol and coated with polyclonal antibodies against AFM₁ (pAb-AFM₁). The sensor is immersed in the milk sample after addition of HRP-AFB₁ conjugate which competes with free aflatoxin for the antibody binding sites. Bound labeled toxin creates a change of electrochemical potential of more than 300 mV during enzymatic decomposition of H₂O₂ in the presence of p-HPPA. This signal is proportionally reduced depending on the AFM₁-concentration in the sample.

3.1.3 Experimental

3.1.3.1 Chemicals

HRP-AFB₁ conjugate was obtained from R-Biopharm Rhône Ltd. (Glasgow, Scotland) and pAb-AFM₁ from R-Biopharm AG (Darmstadt, Germany). HRP-AFB₁ conjugate's concentration was determined photometrically at 403 nm [14]. The concentration of pAb-AFM₁ was determined photometrically at 280 nm. AFM₁ was purchased as solid powder from Sigma-Aldrich and dissolved in Methanol (>99.9%) for 4 h at room temperature. The concentration of AFM₁ was determined photometrically at 357 nm using a molar extinction coefficient of $2.15 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3-(3-Hydroxyphenyl)propionic acid (≥98%) was purchased from AlfaAesar. The ready-to-use substrate SIGMAFAST™ OPD was purchased from Sigma-Aldrich, the TMB PLUS from Kem-En-Tec Diagnostics and QuantaBlu™ from Thermo Scientific. All other chemicals were of analytical grade quality or better and were purchased from Sigma-Aldrich.

The pH of all buffers was adjusted with 1 mol L⁻¹ NaOH solution.

3.1.3.2 Instrumental

Polypyrrol-coated electrodes produced by screen printing (Fig. 1) and the computer controlled potentiometer device including application software were provided by Sortec Ltd. (Cambridge, England).

3.1.3.3 Immuno-coating

The immunosensor's measuring electrode (1 mm²) was coated with 3 μL pAb-AFM₁ in 0.1 mol L⁻¹ potassium phosphate buffer (pH 5.0) and then incubated at 37 °C for 10 min. Afterwards the measurement electrode was washed (3x) with distilled water (0.054 μS at 25 °C) and immersed in the protein free blocking reagent (StabilGuard® Choice, SurModics) at room temperature for 10 min. Finally, the

immunosensor was dried for 30 min at 37 °C. The coated immunosensors were stored for up to 6 months at 6 ± 2 °C in a light and humidity protected environment.

3.1.3.4 Test procedure

For all measurements 315 µL sample solution was mixed with 35 µL HRP-AFB₁ conjugate dissolved in 0.1 mol L⁻¹ 3-(N-tris-(hydroxymethyl)methylamino)-2-hydroxypropanesulfonic acid (TAPSO) pH 7.0 and 200 µL thereof were transferred into a well of a 96-well microtiter plate (Sarstedt, Germany). The measurement electrode was immersed into this solution for 5 min. After that, the immunosensor was washed (3x) thoroughly with 0.1 mol L⁻¹ potassium phosphate buffer pH 7.8 and dried with a paper tissue. For the actual measurement the immunosensor was then plugged into one of the potentiometer's 12 connection slots and both, reference electrode and measurement electrode, were immersed into one well of a 96-well plate filled with 350 µL of substrate solution (buffer solution containing urea hydrogen peroxide and the respective electron donating compound). Afterwards the immunosensor was brought to its base potential for 15 s before the measurement started. The specific base potential for each substrate solution was determined as follows. An antibody coated immunosensor was immersed in the substrate solution until a stable signal was obtained (approx. after 90 s). The average signal of five independently measured immunosensors represents the specific base potential for each substrate solution. This base potential was then set actively for 15 s before the measurement itself started.

3.1.3.5 Milk samples

Milk samples used were bought at local supermarkets and examined with RIDASCREEN® Aflatoxin M₁ 30/15 ELISA-Kit R-Biopharm AG (Darmstadt, Germany), exhibiting a detection limit of 5 pg mL⁻¹. AFM₁ negative milk samples were used for spiking experiments. Spiking was accomplished with stock solution (methanol) containing 100 ng AFM₁ per mL.

3.1.3.6 Calculations

For comparison of the different electron donating compounds the measurement signals were transformed into a relative signal (RS), using the following formula:

$$RS (\%) = S/S_{\max} \times 100 \quad (1)$$

S is the signal intensity of an electron donating compound in the test series and S_{max} is the strongest signal within the respective test series.

The calibration curve (Fig. 8) for the determination of the AFM₁-content of the spiked milk samples was fitted using a non-linear four parameter logistic function (SigmaPlot 8.0). The formula of the four parameter logistic function is:

$$y = y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b} \quad (2)$$

The detection limit (LOD) was defined as the concentration of AFM₁ equivalent to three times the value of the standard deviation (s), measured in the absence of AFM₁.

3.1.4 Results and discussion

3.1.4.1 Influence of the phenol's substituent and substituent's position on signal intensity

Oxidation of phenols [15, 16], particularly p-HPPA and p-methylphenol, by peroxidase has been often used to generate a fluorescent read-out. Here we tested p-HPPA and the derivatives p-hydroxyphenylacetic acid and p-hydroxybenzoic acid as well as p-methylphenol derivatives, such as p-ethylphenol and p-propylphenol, for their suitability to generate an intense potentiometric signal. The results (Fig. 2) show that the signal intensity increases with a growing span between the carbonic acid and the

aromatic ring, whereas for the electron donating compounds with an aliphatic residue the signal intensity decreases with increasing chain length. To examine the effect of the substituent's position on the signal intensity the ortho- and meta-isomers of p-HPPA and p-methylphenol, respectively, were tested. Fig. 3 shows that the substituents in para-position generate the strongest signal, followed by those in meta-position. The ortho substituted isomers yield the lowest signal.

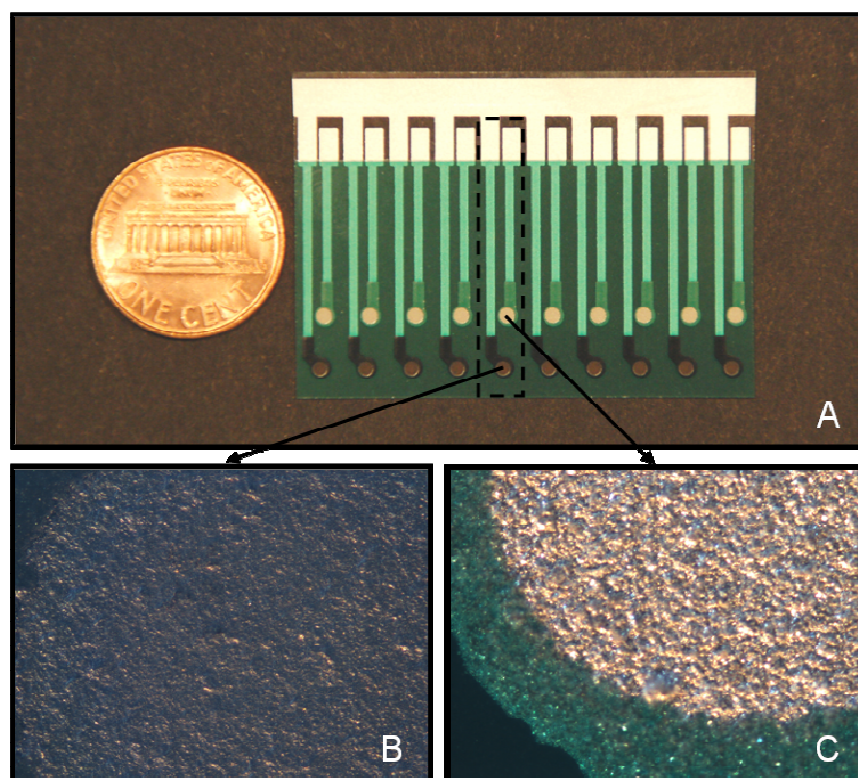


Fig. 1. (A) Photographical image of the screen printed sensor strips. Each sensor consists of a measurement electrode and a Ag/AgCl reference electrode (marked section). (B) 100x magnification of the measurement electrode. (C) 100x magnification of the Ag/AgCl reference electrode.

Based on the fact that 80% of the reaction products during oxidation of p-methylphenol by HRP in aqueous reaction media are Pummerer's type ketones [17], it can be assumed that the formation of Pummerer's type ketones is mainly responsible for the signal generation. Formation of Pummerer's type ketones depends on the size of the p-substitutes [18] preferring small aliphatic substituents, as found in this study for the derivatives of p-methylphenol. The lower reactivity of phenols with a carboxylic acid substituent is due to the carboxylic acid's -I-effect.

Substituents exhibiting a +I-effect are faster converted enzymatically than those with a –I-effect [19]. However, with growing distance between carboxylic function and aromatic core the –I-effect is lowered. The reason why p-HPPA generates a slightly stronger potentiometric signal than p-methylphenol is that the type of Pummerer's ketone formed by p-HPPA bears two negative charges due to the two carboxyl groups, whereas that formed out of p-methylphenol carries no charge.

In addition steric hindrance by bulky carboxylic acid substituents has a major influence on the formation of Pummerer's type ketones, which proceeds via an ortho-para dimer with subsequent intermolecular Michael addition [20] and therefore requires accessible ortho- and para-positions on the molecules. The closer the carboxylic function to the aromatic core, the less likely the reaction becomes. After formation of the ortho-para dimer tautomerization follows which requires an unsaturated ortho-position. Showing two resonance structures with a hydrogen atom at the ortho-position of the aromatic ring, meta- respectively para-substituted phenols form the Pummerer's type ketones faster than ortho-substituted phenols (one resonance structure), whereby para-substituted phenols generate a stronger signal than the meta-substituted phenols.

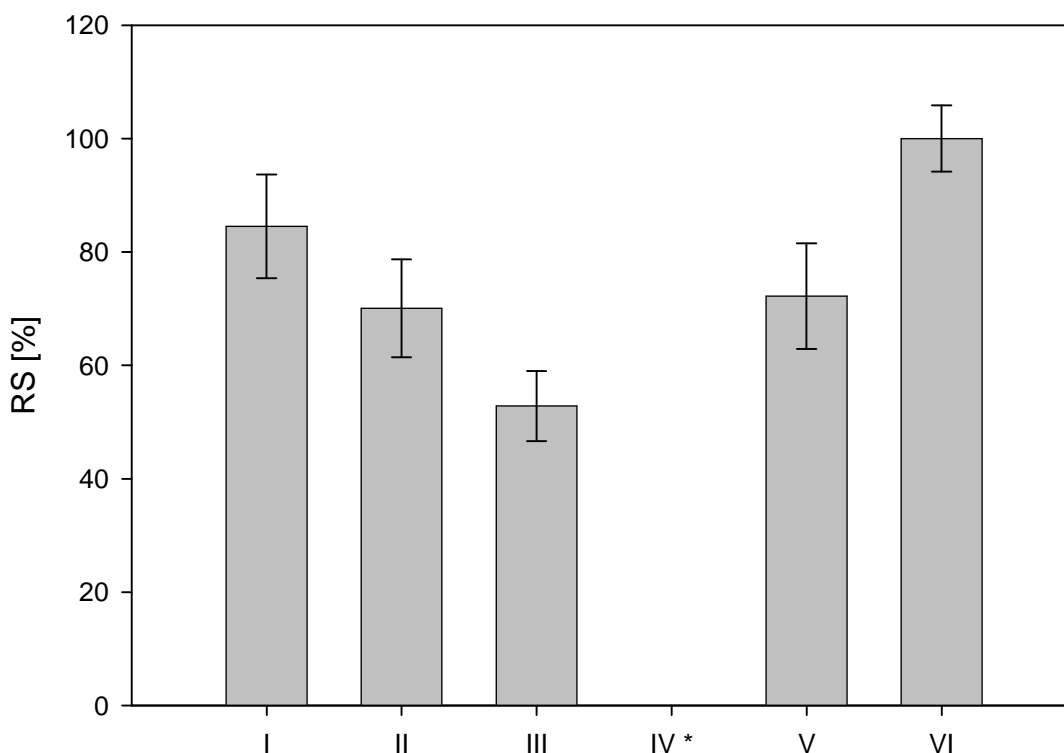


Fig. 2. Influence of the p-substituent on the signal intensity. All electron donating compounds were used at a concentration of 10 mmol L⁻¹ in 25 mmol L⁻¹ Na-citrate buffer (pH 5, containing 5 mmol L⁻¹ urea hydrogen peroxide). The measurement electrode was coated with 25 µg mL⁻¹ pAb-AFM₁ and the concentration of the HRP-AFB₁ was 1.95 µg mL⁻¹. Data represent mean and standard deviation (n=3). (I: p-methylphenol; II: p-ethylphenol; III: p-propylphenol; IV: p-hydroxybenzoic acid; V: p-hydroxyphenylacetic acid; VI: p-HPPA). *No signal obtained.

The binding region for aromatic electron donating compounds of HRP is a hydrophobic pocket formed by amino acid residues and the hem-group [21] where an arginine residue donates one hydrogen bond to the phenolic oxygen of the reducing substrate [22]. The closer the substituent to the hydroxyl-group the more difficult the binding to this hydrophobic pocket will be. This explains why the HPPA-isomers o-HPPA and m-HPPA with a bulky and hydrophilic substituent generate a slightly lower signal than o-methylphenol and m-methylphenol.

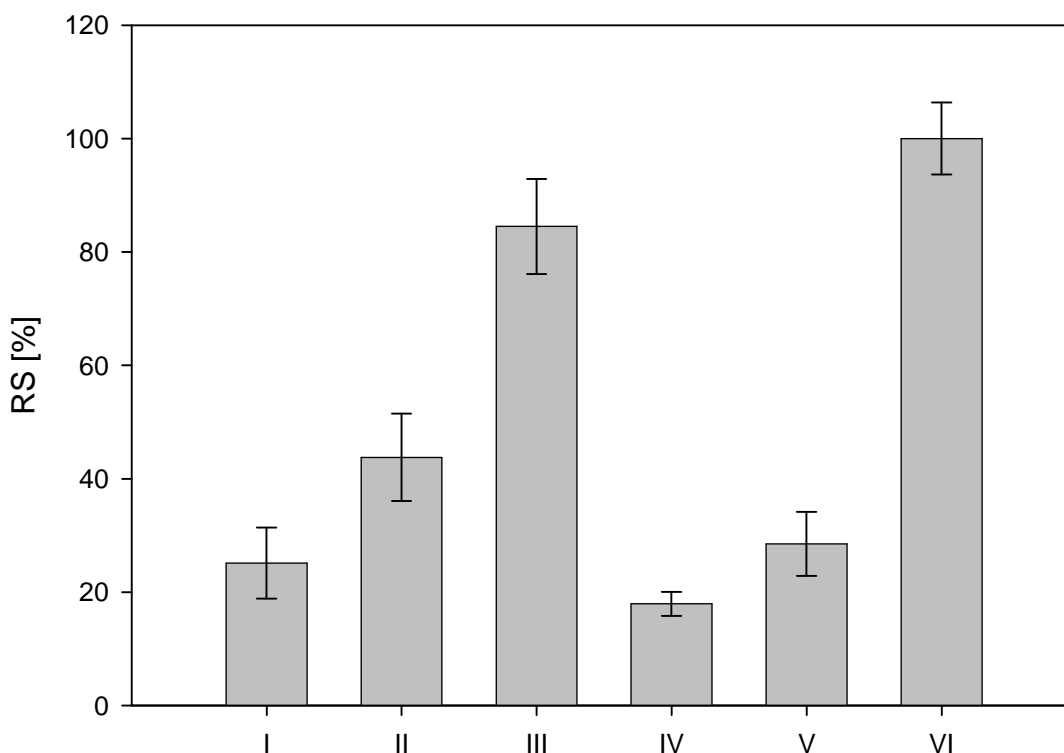


Fig. 3. Influence of substituent's position on signal intensity. All electron donating compounds were used at a concentration of 10 mmol L⁻¹ in 25 mmol L⁻¹ Na-citrate buffer (pH 5, containing 5 mmol L⁻¹ urea hydrogen peroxide). The measurement electrode was coated with 25 µg mL⁻¹ pAb-AFM₁ and the concentration of the HRP-AFB₁ was 1.95 µg mL⁻¹. Data represent mean and standard deviation (n=3). (I: o-methylphenol; II: m-methylphenol; III: p-methylphenol; IV: o-HPPA; V: m-HPPA; VI: p-HPPA).

3.1.4.2 Influence of p-HPPA concentration on signal intensity

Preliminary data showed that urea hydrogen peroxide concentration had no significant influence on the signal intensity of p-HPPA in a range of 1-9 mmol L⁻¹ and an urea hydrogen peroxide concentration of 5 mmol L⁻¹ was chosen for further investigations. The concentration of p-HPPA was found to have a distinct effect on the signal intensity, as depicted in Fig. 4. The signal intensity increased with decreasing p-HPPA concentration and reached a maximum at 10 mmol L⁻¹ p-HPPA.

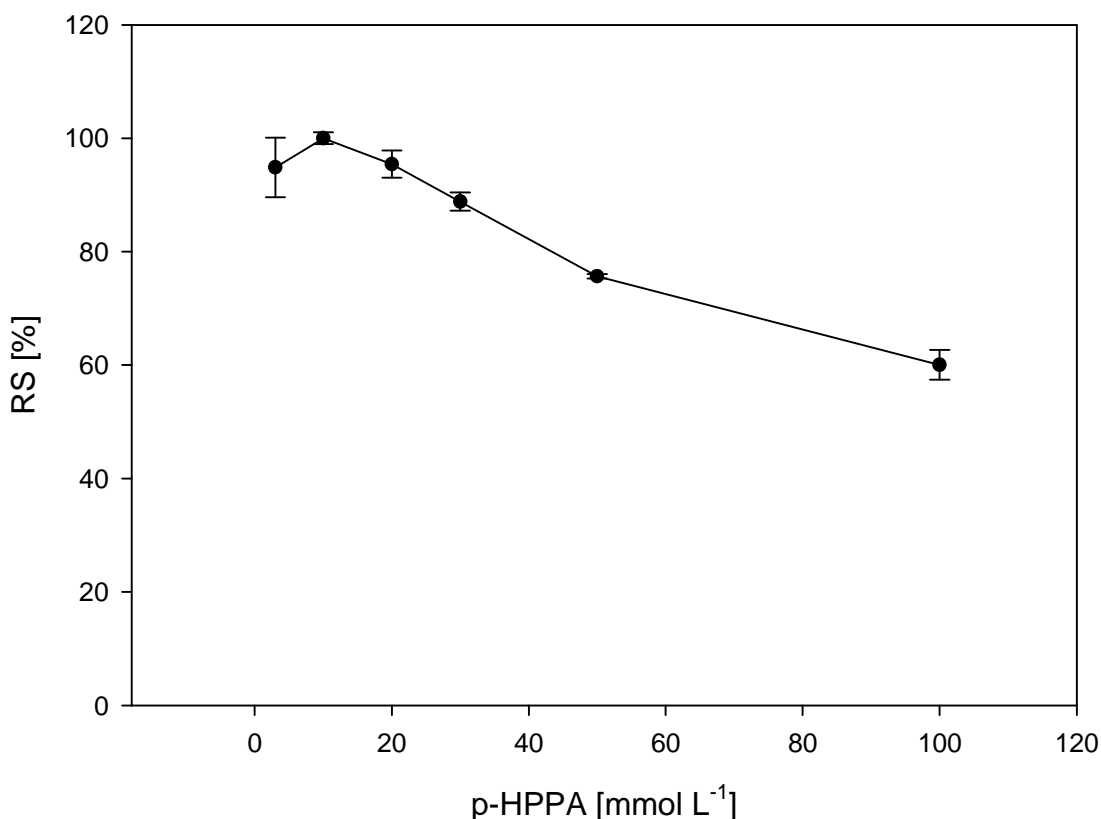


Fig. 4. Influence of p-HPPA concentration on the signal intensity. p-HPPA was tested in a concentration range of 3-100 mmol L⁻¹ in 25 mmol L⁻¹ Na-citrate buffer (pH 5, containing 5 mmol L⁻¹ urea hydrogen peroxide). The measurement electrode was coated with 25 µg mL⁻¹ pAb-AFM₁ and the concentration of the HRP-AFB₁ conjugate was 1.95 µg mL⁻¹. Data represent mean and standard deviation (n=3).

3.1.4.3 Influence of buffer system on signal intensity

Since the influence of different buffer systems on the enzymatic activity of HRP has been described earlier [23, 24], the dependence of signal intensity in our test format on the buffer system was examined by the use of organic citrate-, malate-, succinate- and propionate-buffer. In addition p-HPPA, exhibiting buffering capacity itself, was tested without any additional buffer and phosphate-buffer was chosen as an inorganic buffer system. The data in Fig. 5 show only slight differences between the different buffer-systems and investigations were continued with the p-HPPA buffer to simplify experimental setup.

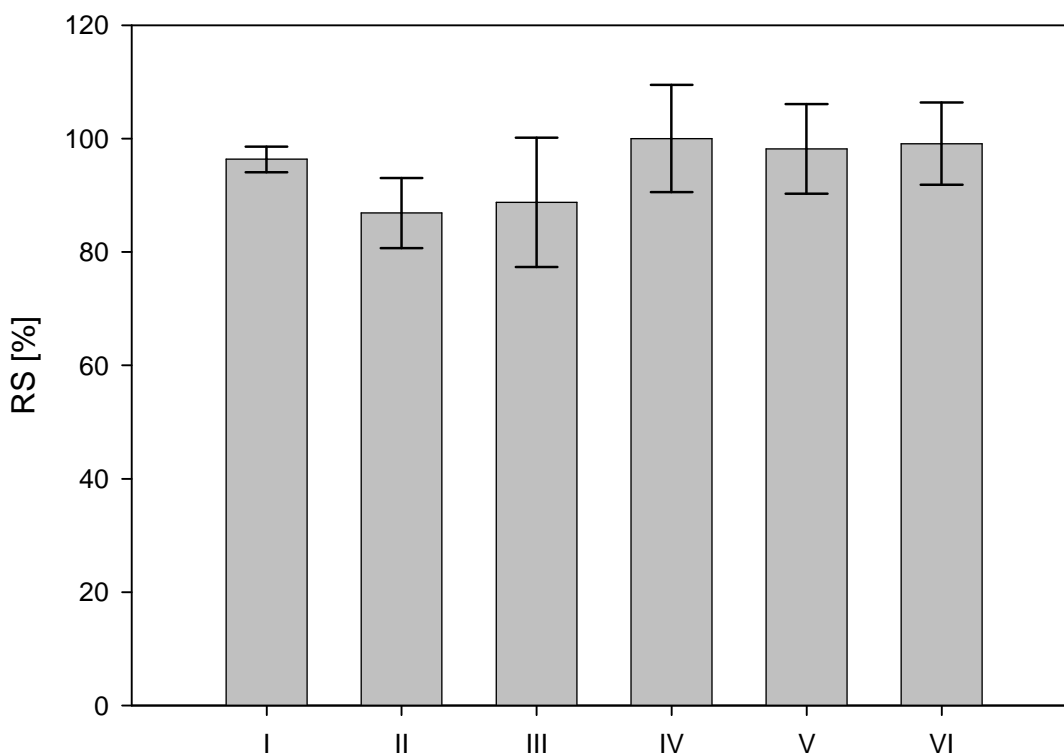


Fig. 5. Influence of buffer-systems on the signal intensity of p-HPPA. All buffer-systems, except the p-HPPA solution, had a concentration of 25 mmol L⁻¹ containing 5 mmol L⁻¹ urea hydrogen peroxide and 10 mmol L⁻¹ p-HPPA. The p-HPPA solution consisted of 10 mmol L⁻¹ p-HPPA with 5 mmol L⁻¹ urea hydrogen peroxide. All buffer-systems were adjusted with NaOH to pH 5. The HPR-AFB₁ conjugate's concentration was 1.95 µg mL⁻¹ and the working electrode was coated with 25 µg mL⁻¹ pAb-AFM₁. Data represent mean and standard deviation (n=4). (I: p-HPPA-buffer; II: citrate-buffer; III: malate-buffer; IV: succinate-buffer; V: propionate-buffer; VI: phosphate-buffer).

3.1.4.4 Influence of pH on signal intensity

In addition, the effect of pH on p-HPPA's signal intensity was examined. Substrate media were prepared using 25 mmol L⁻¹ citrate-buffer (pH 3-5) and 25 mmol L⁻¹ phosphate-buffer (pH 6-8.5) respectively. The results in Fig. 6 revealed a significant correlation between the substrate medium's pH and the detected signal intensity. The curve shows a plateau between pH 3.5 and 6.5 where the signal intensity is nearly constant and reaches its maximum at pH 4.5. At pH values below 3.5 and above 6.5 the signal decreased rapidly.

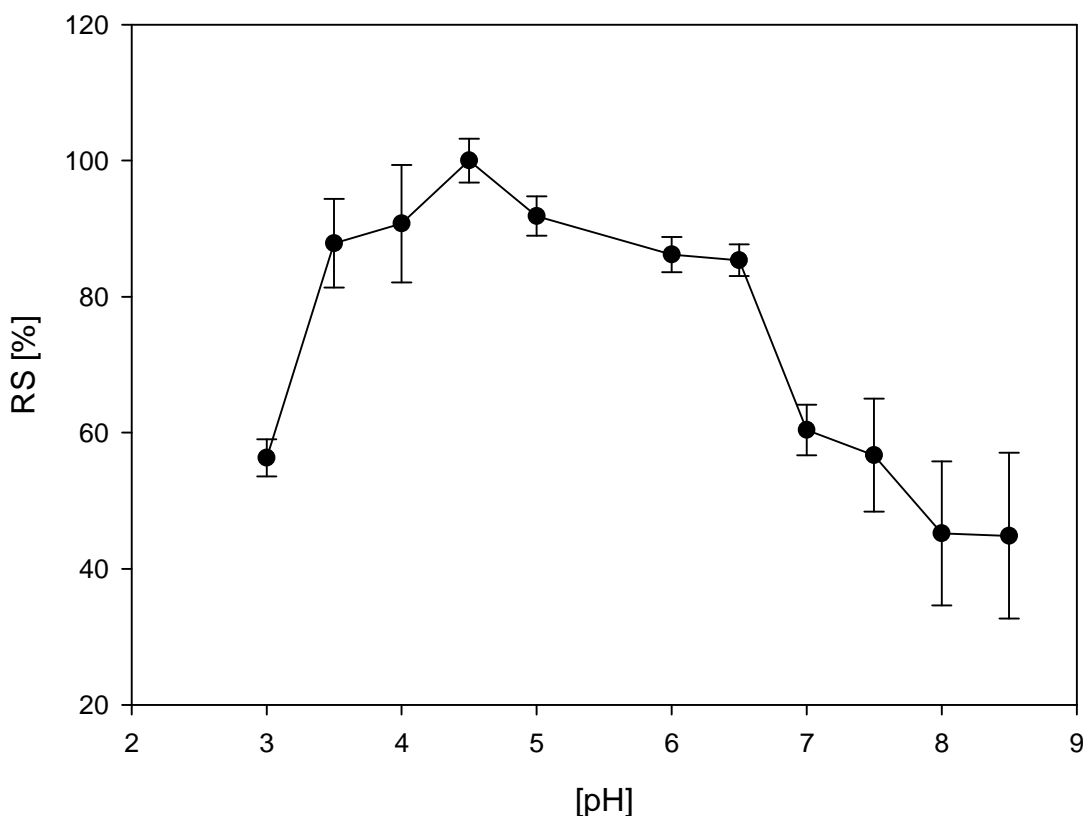


Fig. 6. Dependence of p-HPPA's signal intensity on pH of the substrate buffer. 25 mmol L⁻¹ Na-citrate buffer was used for pH 3-5 and 25 mmol L⁻¹ phosphate buffer for pH 6-8.5. The p-HPPA concentration of all substrate buffers was 10 mmol L⁻¹ and the urea hydrogen peroxide concentration was 5 mmol L⁻¹. The measurement electrode was coated with 25 µg mL⁻¹ pAb-AFM₁ and the concentration of the HRP-AFB₁ conjugate was 1.95 µg mL⁻¹. Data represent mean and standard deviation (n=4).

3.1.4.5 Comparison of p-HPPA to commercial HRP-substrates

After determining optimum reaction conditions, p-HPPA was compared to different commercially available and commonly applied HRP-substrate preparations. Those were SIGMAFAST™ (OPD as electron donating compound), TMB PLUS (TMB as electron donating compound), ABTS as electron donating compound and QuantaBlu™ (p-HPPA as electron donating compound). Data in Fig. 7 show that the p-HPPA formulation developed by us generated the highest signal. Since direct comparison of the signal levels was difficult due to different base potentials, potential

differences as well as maximum and relative test signals (mV) are shown in Table 1. Differences in the signal generation between the substrates are depicted in Fig. 7. SIGMAFAST™ reached the signal maximum already after 73 s, followed by p-HPPA (own formulation) after 131 s, TMB PLUS after 223 s and ABTS after 236 s. QuantaBlu™ still had not reached its signal maximum after 370 s.

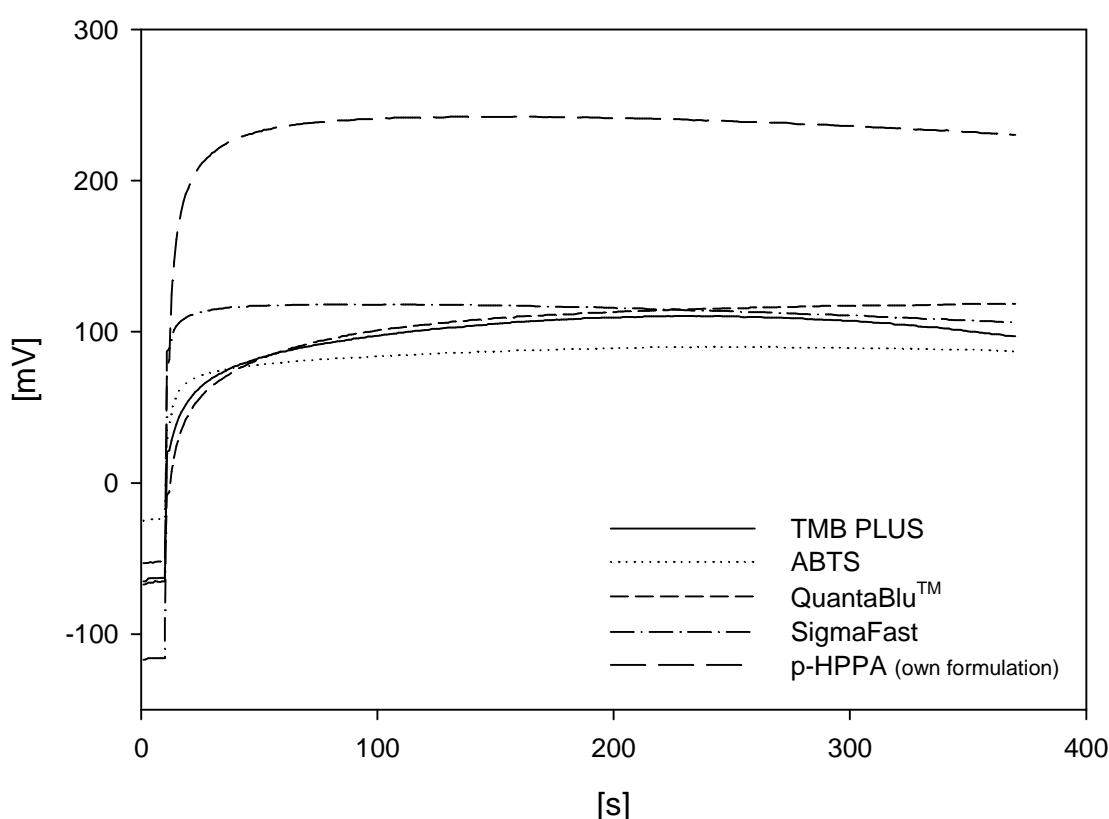


Fig. 7. Comparison of the signal development of commercial substrate solutions and the optimized p-HPPA substrate. Before each measurement the biosensor was set to the base potential of the respective substrate solution for 15 s. The measurement electrode was coated with 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pAb-AFM₁ and the concentration of the HRP-AFB₁ conjugate was 1.95 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Data represent mean values of four measurements.

Table 1 Summary of the base potentials, maximum signals, potential differences and relative signals of the substrates tested. The standard deviation is given in parentheses (n=4).

	ABTS	p-HPPA (own formulation)	p-HPPA (QuantaBlu™)	OPD (SIGMAFAST™)	TMB (TMB PLUS)
Base potential [mV]	-20 (10.4)	-80 (11.3)	-50 (6.9)	-131 (8.7)	-46 (23.8)
Maximum signal [mV]	90 (2.2)	242 (9.5)	118 (2.8)	118 (2.9)	112 (22.7)
Potential difference [mV]	110	322	168	249	158
Relative signal [%]	34	100	52	77	49

3.1.4.6 Use of p-HPPA in the potentiometric aflatoxin M₁-immunosensor

Using the optimized p-HPPA formulation as substrate solution for HRP the aflatoxin M₁ immunosensor was developed using a direct competitive assay format applicable to the FDA action level for AFM₁ in milk at 500 pg mL⁻¹. By varying the coating concentration of the pAb-AFM₁ on the working electrode (Fig. 8), the adjustment of the 50% dose of the assay to this limit could be achieved. Using a coating concentration of 15 µg mL⁻¹ resulted in a 50% dose of 426 pg mL⁻¹, but exhibiting a narrow working range. The curve of the electrodes coated with 20 µg mL⁻¹ pAb-AFM₁ showed an acceptable 50% dose of 906 pg mL⁻¹ as well as a wide working range of 250-2000 pg mL⁻¹; the detection limit was at 40 pg mL⁻¹. Coating with 25 µg mL⁻¹ pAb-AFM₁, however, did no longer allow reliable measurement of 500 pg mL⁻¹.

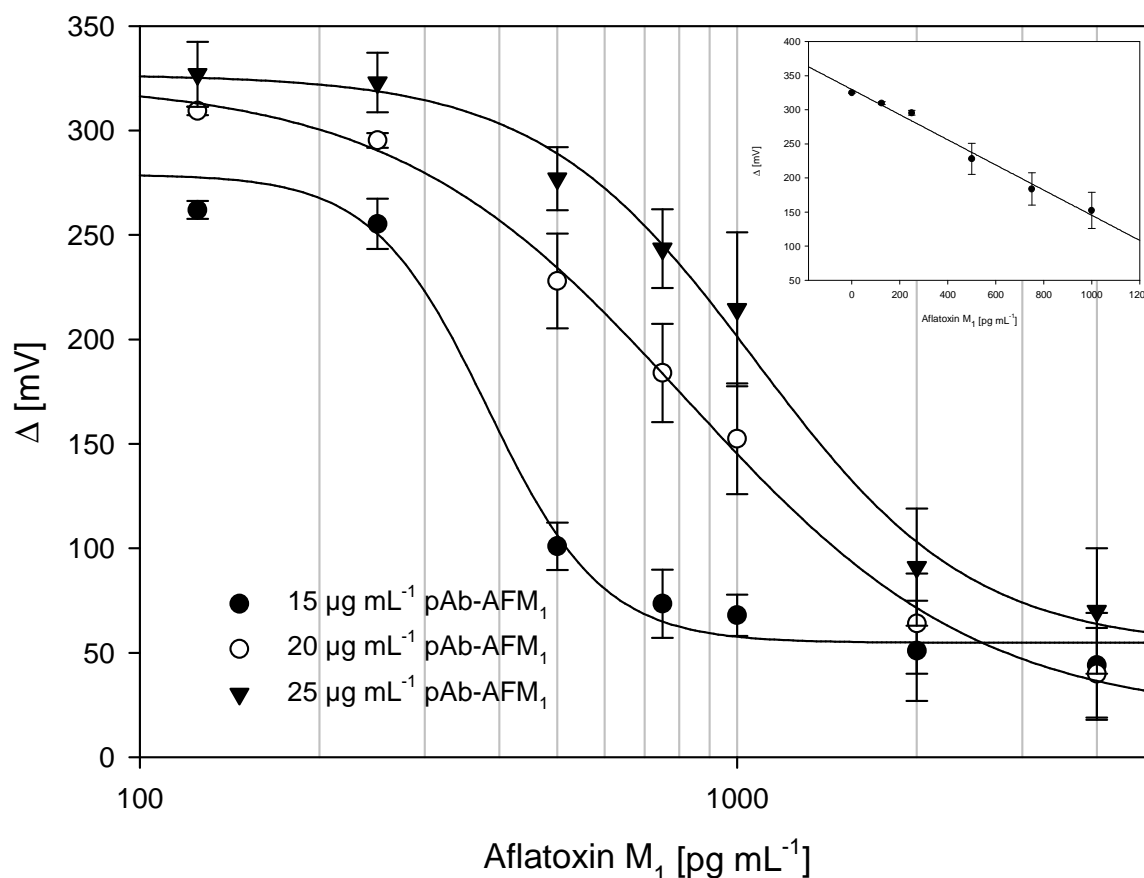


Fig. 8. Calibration curves generated in pasteurized milk with a fat content of 3.8% spiked with AFM₁ in a concentration range from 0 to 4000 pg mL⁻¹. Shown are curves of biosensors coated with 15 μg mL⁻¹, 20 μg mL⁻¹ and 25 μg mL⁻¹ pAb-AFM₁. The y-axis shows the potential difference related to the base potential and the x-axis shows the AFM₁ concentration. Figure in the upper right corner shows the linear regression ($y = 329,67 - 0,184 * x$; ($r^2=0,9857$)) of the working range of the biosensors coated with 20 μg mL⁻¹ pAb-AFM₁. The substrate solution used consisted of 10 mmol L⁻¹ p-HPPA pH 4.5 and 5 mmol L⁻¹ urea hydrogen peroxide; HRP-AFB₁ conjugate's concentration was 1.95 μg mL⁻¹. Data represent mean and standard deviation (n=3).

3.4.1.7 Influence of different milk matrixes on the recovery of AFM₁

Three different commercial pasteurized milk and UHT-milk samples with different fat contents were used. Each of those was spiked with 250, 500 and 1000 pg mL⁻¹ AFM₁ and evaluated for AFM₁-content without sample treatment. The measurement electrodes were coated with 20 μg mL⁻¹ pAb-AFM₁ and the HRP-AFB₁-conjugate was used at a concentration of 1.95 μg mL⁻¹ in 0.1 mol L⁻¹ TAPSO pH 7. Quantification of AFM₁ was done using a calibration curve (0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 and

2000 pg mL⁻¹ AFM₁) set up in pasteurized milk with a fat content of 1.5%. The calibration curve was fitted with a four parameter logistic function. Results of Table 2 show a good discrimination between AFM₁ concentration of 250, 500 and 1000 pg mL⁻¹ for all milk matrices. Overestimation of low AFM₁ concentrations in UHT-milk samples is probably due to the set up of the calibration curve in pasteurized milk. But this fact could be easily solved by adapting the function variables of the four parameter logistic functions to each particular milk matrix.

Table 2 Recovery of AFM₁ from different milk matrices.

AFM ₁ added [pg mL ⁻¹]	AFM ₁ found [pg mL ⁻¹]	RSD ^a	RE ^b [%]	R ^c	AFM ₁ found [pg mL ⁻¹]	RSD	RE [%]	R	AFM ₁ found [pg mL ⁻¹]	RSD	RE [%]	R
Past. milk	0.5% fat				1.5% fat				3.8% fat			
250	210	8	-16	84	230	17	-8	92	185	57	-26	74
500	434	16	-13	87	503	11	1	101	528	10	6	106
1000	855	2	-14	86	982	19	-2	98	916	6	-8	92
UHT-milk	0.3% fat				1.5% fat				3.8% fat			
250	318	44	27	127	276	8	10	110	340	27	36	136
500	542	10	8	108	529	26	6	106	606	9	21	121
1000	918	17	-8	92	977	16	-2	98	902	4	-10	90

^a Relative standard deviation

^b Relative error = (measured value – true value)/true value x 100

^c Recovery

In conclusion, the aflatoxin M₁ immunosensor presented here is easy to handle and allows the reliable screening of AFM₁ at 500 pg mL⁻¹ in different milk matrices in less than 10 min without sample treatment. In addition the use of p-HPPA as electron donating compound for potentiometric measurements has the advantage of low toxicity and does not require the presence of organic solvents in the substrate buffer.

3.1.5 References

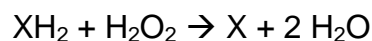
- [1] H. Gourama, L.B. Bullerman, *Journal of Food Protection*, 58 (1995) 1395.
- [2] F.P. Guengerich, T. Shimada, *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 400 (1998) 201.
- [3] J.J. Pestka, Y. Li, W.O. Harder, F.S. Chu, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 64 (1981) 294.
- [4] J.M. Fremy, F.S. Chu, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 67 (1984) 1098.
- [5] E. Märklbauer, G. Terplan, *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 36 (1985) 53.
- [6] F.S. Chu, *Vet. Human Toxicol.*, 32 (1990) 42.
- [7] L. Sibanda, S. De Saeger, C. Van Peteghem, *Int. J. Food Microbiol.*, 48 (1999) 203.
- [8] K. Thirumala-Devi, M.A. Mayo, A.J. Hall, P.Q. Craufurd, T.R. Wheeler, F. Waliyar, A. Subrahmanyam, D.V.R. Reddy, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 933.
- [9] M. Magliulo, M. Mirasoli, P. Simoni, R. Lelli, O. Portanti, A. Roda, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 3300.
- [10] A. Radoi, M. Targa, B. Prieto-Simon, J.L. Marty, *Talanta*, 77 (2008) 138.
- [11] F. Ricci, G. Volpe, L. Micheli, G. Palleschi, *Analytica Chimica Acta*, 605 (2007) 111.
- [12] M. Badea, L. Micheli, M.C. Messina, T. Candigliota, E. Marconi, T. Mottram, M. Velasco-Garcia, D. Moscone, G. Palleschi, *Analytica Chimica Acta*, 520 (2004) 141.
- [13] L. Micheli, R. Grecco, M. Badea, D. Moscone, G. Palleschi, *Biosensors & Bioelectronics*, 21 (2005) 588.
- [14] G.R. Schönbaum, S. Lo, *J. Biol. Chem.*, 247 (1972) 3353.
- [15] B.C. Saunders, A.G. Holmes-Siedle, B.P. Stark, *Peroxidase*, Butterworths, London, 1964.
- [16] W.D. Hewson, H.B. Dunford, *J. Biol. Chem.*, 251 (1976) 6036.
- [17] P. Pietikainen, P. Adlercreutz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33 (1990) 455.

- [18] S.K. Sahoo, W. Liu, L.A. Samuelson, J. Kumar, A.L. Cholli, in: A.N. Cheng, A.D. English (Eds.), *NMR spectroscopy of polymers in solution and in the solid state*, Oxford University Press, New York, 2003, p. 258.
- [19] Y.P. Xu, G.L. Huang, Y.T. Yu, *Biotechnol. Bioeng.*, 47 (1995) 117.
- [20] S.K. Sahoo, W. Liu, L.A. Samuelson, J. Kumar, A.L. Cholli, *Macromolecules*, 35 (2002) 9990.
- [21] A. Henriksen, D.J. Schuller, K. Meno, K.G. Welinder, A.T. Smith, M. Gajhede, *Biochemistry*, 37 (1998) 8054.
- [22] A. Henriksen, A.T. Smith, M. Gajhede, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 35005.
- [23] P.J. Wright, A.M. English, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6 (2001) 348.
- [24] A.N. Eremin, L.P. Budnikova, O.V. Sviridov, D.I. Metelitsa, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 38 (2002) 151.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen einfachen, schnellen und kostengünstigen Aflatoxin M₁-Immunosensor zu entwickeln, der zuverlässig 500 ppt Aflatoxin M₁ (US-amerikanischer Grenzwert) in verschiedenen Milchmatrices detektieren kann. Die Fokussierung bei der Entwicklung des Aflatoxin M₁-Immunosensors lag zum einen auf dem Testdesign und zum anderen auf der Entwicklung eines geeigneten Substratmediums für die Meerrettichperoxidase (HRP). Da das Testdesign maßgeblich durch die Wahl der Sensorplattform vorgegeben war, konzentrierten sich hier die Optimierungsarbeiten hauptsächlich auf das Testabarbeitungsprotokoll und das Nachweisprinzip (direkter oder indirekter Nachweis). Die HRP als enzymatischer Signalgeber bietet eine Vielfalt an Entwicklungsmöglichkeiten aufgrund ihrer geringen Elektronendonatorspezifität.

Enzyme sind bei den heutigen immunologischen Testformaten die am häufigsten eingesetzten Signalgeber. Insbesondere haben sich die alkalische Phosphatase und die HRP in diesem Bereich etabliert und bewährt. Für den in dieser Arbeit entwickelten Immunosensor zum Nachweis von Aflatoxin M₁ in Kuhmilch wurde die HRP als Signalgeber eingesetzt. HRP (EC 1.11.1.7) ist eine aus Meerrettich (*Armoracia rusticana*) isolierte Peroxidase und zählt zu den Oxidoreduktasen. Das Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 40 000 Da besteht zu 18% aus Kohlenhydraten [HEWSON et al., 1979]. Weiter setzt sie sich aus zwei Calciumionen und einem Häm b als prosthetische Gruppe zusammen. Die enzymatische Aktivität der HRP besteht darin, mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) verschiedene organische Elektronendonatoren (XH₂) zu oxidieren:



Die Tatsache, dass die HRP im Bezug auf ihre Elektronendonatoren sehr unspezifisch ist, wurde bei der Suche nach dem besten Elektronendonator für den Aflatoxin M₁-Immunosensor genutzt. Hierdurch ließen sich die Einflüsse der Substituenten und deren Positionen am Grundgerüst des Elektronendonators auf die Signalstärke systematisch und gezielt untersuchen.

Da die üblicherweise eingesetzten Verbindungen wie OPD ein hohes toxisches Potential aufweisen oder wie TMB im potentiometrischen Immunosensor nur ein geringes Signal generierten, konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Etablierung eines alternativen Elektronendonators. Die Oxidation phenolischer Verbindungen wie p-HPPA oder p-Methylphenol durch die HRP ist seit langem bekannt und beschrieben [SAUNDERS et al., 1964; HEWSON et al., 1976]. Bei der systematischen Suche nach dem optimalen HRP-Elektronendonator für den entwickelten Immunosensor wurde deshalb der Fokus auf die Messsignaleigenschaften der Derivate von p-HPPA und p-Methylphenol gelegt. Die potentiometrischen Messsignale zeigten bei der Untersuchung der Derivate von p-HPPA und p-Methylphenol ein gegensätzliches Ergebnis: bei den p-HPPA Derivaten nahm die Signalstärke mit wachsendem Abstand der Carboxylgruppe zum aromatischen Ring zu, wohingegen die Signalstärke bei den Derivaten des p-Methylphenols mit wachsendem aliphatischen Rest abnahm. Der Vergleich der ortho- und meta-Isomere von p-HPPA bzw. p-Methylphenol zeigte hingegen bei beiden Testreihen, dass die Signalstärke in der Reihenfolge ortho, meta und para ansteigt. Dieses Ergebnis und die Tatsache, dass bei der Oxidation von p-Methylphenol durch die HRP im wässrigen Medium 80% der Reaktionsprodukte Pummerer's type Ketone sind [PIETIKAINEN et al., 1990], deutete darauf hin, dass Pummerer's type Ketone eine entscheidende Rolle bei der Signalentstehung im potentiometrischen Immunosensor spielen. Dies wird dadurch untermauert, dass die Bildung der Pummerer's type Ketone begünstigt wird, wenn sich in para-Position des Elektronendonators ein kleiner aliphatischer Substituent befindet [SAHOO et al., 2003]. Diese Tatsache spiegelt sich auch in den oben angesprochenen Ergebnissen zu den p-Methylphenol Derivaten wieder.

Andererseits wurde bei den p-HPPA Derivaten ein gegenteiliger Effekt beobachtet – je länger der Abstand der Carboxylgruppe zum aromatischen Ring war, desto höhere Signalintensitäten wurden erhalten. Der Grund hierfür dürfte der durch die Carboxylgruppe verursachte -I-Effekt auf den aromatischen Ring sein. Es ist bekannt, dass Phenole mit Substituenten die einen +I-Effekt haben, schneller enzymatisch umgewandelt werden als solche mit einem -I-Effekt [Xu et al., 1995]. Da sich der -I-Effekt auf den aromatischen Ring mit zunehmendem Abstand verringert, ist der -I-Effekt beim p-HPPA am geringsten und dieses Derivat wird deshalb auch am

schnellsten durch die HRP umgesetzt. Der Grund, weshalb p-HPPA ein etwas stärkeres Signal als p-Methylphenol generiert, liegt an den zwei negativen Ladungen, die das aus p-HPPA gebildete Pummerer's type Keton trägt. Im Gegensatz hierzu besitzt das aus p-Methylphenol gebildete Pummerer's type Keton keinerlei Ladungen.

Die Ursache für die unterschiedlichen Signalstärken der Isomere von p-HPPA bzw. p-Methylphenol ist der Reaktionsmechanismus, der bei der Bildung des Pummerer's type Ketons abläuft. Das Pummerer's type Keton bildet sich über ein ortho-para Dimer mit darauf folgender Tautomerisierung und abschließender intermolekularer Michael-Addition [SAHOO et al., 2002]. Für diesen Reaktionsmechanismus ist somit eine zugängliche ortho- und para-Position am umzusetzenden Molekül essentiell. Des Weiteren kann die Tautomerisierung nur dann erfolgen, wenn sich in ortho-Position ein Wasserstoffatom befindet. Ebenso wird für die anschließende Michael-Addition ein Wasserstoffatom in ortho-Position benötigt. Diese Voraussetzungen erfüllt das meta- und para-substituierte Phenol, wohingegen das ortho-substituierte Phenol nur eine freie Position besitzt. Hierdurch können die meta- und para-substituierten Phenole schneller zum Pummerer's type Keton reagieren als ortho-substituierte und generieren deshalb auch ein stärkeres Signal. Dass wiederum die para-substituierten Phenole ein stärkeres Signal als die meta-substituierten zeigen hat sterische Gründe. Aufgrund der benachbarten Lage von der substituierten meta-Position zur für die Reaktion benötigten ortho-Position, findet durch den Substituent in meta-Position eine stärkere sterische Behinderung statt, als es bei einem Substituent in para-Position der Fall ist.

Die Ursache dafür, dass die p-HPPA Isomere o-HPPA und m-HPPA etwas schwächere Signale als die Isomere des p-Methylphenols generierten, könnte am Aufbau der HRP-Bindungstasche für den Elektronendonator liegen. Bei der Elektronendonator-Bindungstasche handelt es sich um eine hydrophobe Tasche, die aus Aminosäureseitenketten und der Häm-Gruppe gebildet wird [HENRIKSEN et al., 1998]. In dieser bindet der Elektronendonator über seine phenolische OH-Gruppe an die Aminosäureseitenkette eines Arginins [HENRIKSEN et al., 1999]. In einer so aufgebauten Bindungstasche können deshalb

Elektronendonatoren mit einem hydrophoben Substituenten besser binden als solche mit einem hydrophilen Substituenten.

Nachdem sich p-HPPA als der geeignetste Elektronendonator für die HRP im potentiometrischen Testsystem erwiesen hatte, konnten gezielt weitere Einflussgrößen auf die Signalgenerierung untersucht werden. Hierbei stellte sich heraus, dass sowohl die Konzentration des p-HPPA als auch der pH-Wert einen großen Einfluss auf die Signalstärke haben, während das verwendete Puffersystem und die Peroxidkonzentration nur eine untergeordnete Rolle spielen. Die aus diesen Ergebnissen resultierende Substratmedium-Rezeptur zeigte im Vergleich zu vier kommerziell erhältlichen Substratmedien das stärkste Signal, obwohl mit QuantaBlu™ auch ein Substratmedium getestet wurde, das ebenfalls p-HPPA als Elektronendonator enthält. Bei der Entwicklung des HRP-Substratmediums konnte somit gezeigt werden, dass die Sensortechnik grundsätzlich andere Anforderungen an den Elektronendonator der HRP hat als z.B. ELISA-Techniken. Dennoch findet man in Publikationen über Sensortechnik immer wieder die klassischen chromogenen Elektronendonatoren der HRP wie z.B. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), obwohl kein optisches Signal detektiert werden soll. Das optimierte Substratmedium, mit einem pH-Wert von 4,5 bestehend aus 5 mmol L⁻¹ Harnstoff-Wasserstoffperoxid und 10 mmol L⁻¹ p-HPPA, wurde für die weitere Entwicklung des potentiometrischen Immunosensors zum Nachweis von Aflatoxin M₁ in Kuhmilch eingesetzt.

In Vorversuchen zeigte ein direkt-kompetitiver Testaufbau des Immunosensors die besseren Testergebnisse als die indirekt-kompetitive Testvariante (Daten nicht dargestellt), so dass der direkt kompetitive Aufbau für die Testentwicklung ausgewählt wurde. Der kompetitive Aufbau musste aufgrund des geringen Molekulargewichts von Aflatoxin M₁ (328 g/Mol) gewählt werden. Solche niedermolekularen Analyte, auch als Haptene bezeichnet, besitzen nur ein Epitop und damit kann auch nur ein Antikörper an das Hapten binden. Für die Signalgenerierung wurde deshalb ein Konjugat aus HRP und Aflatoxin B₁ eingesetzt. Der Grund für die Verwendung von Aflatoxin B₁ anstelle von Aflatoxin M₁ für das Konjugat liegt darin, dass die Synthese des HRP-Konjugats mit Aflatoxin B₁ einfacher und dass Aflatoxin M₁ als Rohstoff um ein vielfaches teurer als Aflatoxin B₁ ist.

Vorraussetzung für die Einsetzbarkeit eines solchen Konjugats war die vorhandene Kreuzreaktivität des eingesetzten polyklonalen Anti-Aflatoxin M₁ Kaninchenantikörpers mit Aflatoxin B₁. Während der Etablierung des direkt-kompetitiven Immunosensors, bestehend aus einer antikörperbeschichteten Messelektrode und dem HRP-Aflatoxin B₁ Konjugat, zeigte sich, dass über die Antikörperbeschichtungskonzentration sowohl der Arbeitsbereich als auch die 50%-Dosis des Testsystems sehr effektiv einzustellen ist. Der beste Kompromiss zwischen Arbeitsbereich und 50%-Dosis für die Bestimmung des US-amerikanischen Aflatoxin M₁-Grenzwerts (500 pg mL⁻¹) lag bei einer Beschichtungskonzentration von 20 µg mL⁻¹. Mit so hergestellten Immunosensoren konnten sowohl in H-Milch als auch in frischer Vollmilch, die einen Fettgehalt von 0,3% - 3,8% hatten, Aflatoxin M₁-Konzentrationen von 250, 500 und 1000 pg mL⁻¹ sicher nachgewiesen werden. Die Reproduzierbarkeit des Testsystems könnte noch dadurch verbessert werden, wenn an die jeweilige Milchmatrix angepasste Kalibrierkurven in der Auswertungssoftware hinterlegt würden.

Aflatoxin M₁-Immunosensoren wurden auch schon früher in der Literatur beschrieben. Prinzipiell weisen die bislang beschriebenen Aflatoxin M₁-Immunosensoren (siehe Tab. 2 für einen Überblick) höhere Sensitivitäten auf, als der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte potentiometrische Immunosensor (Nachweisgrenze 40 ppt). Das entwickelte Testsystem zeichnet sich aber durch eine deutlich kürzere Analysenzeit aus. Auch aufwendige und zeitintensive Probenvorbereitungsschritte, wie es bei den anderen Aflatoxin M₁-Immunosensoren beschrieben wird, benötigt das in dieser Arbeit optimierte Testsystem nicht. Des Weiteren wird für die Testdurchführung nur ein minimales und leicht zu transportierendes Equipment benötigt. Aufgrund dieser Vorteile gegenüber den bisher beschriebenen Aflatoxin M₁-Immunosensoren ist der hier beschriebene Aflatoxin M₁-Immunosensor optimal zur Vorort-Analyse geeignet.

Abschließend lässt sich feststellen, dass mit dem entwickelten Aflatoxin M₁-Immunosensor dieses Mykotoxin in weniger als 10 Minuten und ohne Probenaufarbeitung in Konzentrationen ab 250 pg mL⁻¹ in verschiedenen Milchmatrices zuverlässig und reproduzierbar nachzuweisen ist. Um Aflatoxin M₁ auch auf dem Niveau des europäischen Grenzwertes (50 ppt) nachweisen zu

können, müsste das System z.B. durch den Einsatz höher affiner Antikörper noch weiter optimiert werden.

Das für den Immunosensor entwickelte HRP-Substratmedium enthält weder giftige Lösungsmittel noch toxische Substanzen und könnte daher auch in weiteren zukünftigen Arbeiten zur Entwicklung potentiometrischer Nachweisverfahren breiten Einsatz finden. Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen lässt sich feststellen, dass HRP-Elektronendonatoren für potentiometrische Immunosensoren insbesondere dann gut geeignet sind, wenn (i) der HRP Elektronendonator durch die enzymatische Umsetzung der HRP Pummerer's type Ketone bildet und (ii) der HRP-Elektronendonator durch die enzymatische Umsetzung der HRP Dimere bzw. Polymere bildet.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein potentiometrischer Immunosensor für den Nachweis von Aflatoxin M_1 in Kuhmilch entwickelt, wobei insbesondere die Optimierung eines an das Testverfahren angepassten Meerrettichperoxidase (HRP)-Elektronendonators im Vordergrund stand.

Die im Siebdruckverfahren hergestellte Immunosensorplattform bestand aus einer elektrochemisch mit Polypyrrol beschichteten Arbeitselektrode, eine Ag/AgCl Elektrode dient als Referenzelektrode. Die Arbeitselektrode wurde mit einem polyklonalen Anti-Aflatoxin M_1 -Antikörper beschichtet und ein Aflatoxin B_1 -HRP Konjugat diente als markiertes Antigen im direkt-kompetitiven Testaufbau.

Bei der Optimierung des potentiometrischen Messsystems unter Verwendung verschiedener phenolischer Verbindungen stellten sich Methylphenole und Hydroxyphenylpropionsäuren (HPPA) als geeignetste Elektronendonatoren für die HRP heraus. Detailliertere Untersuchungen unter Verwendung von Isomeren und Derivaten dieser Verbindungen zeigten, dass die Höhe des generierten Messsignals mit der Bildung von Pummerer's type Ketonen korreliert. Die höchsten Signalintensitäten wurden mit p-HPPA erhalten, das sich zudem im Vergleich zu herkömmlichen Elektronendonatoren wie OPD oder TMB durch eine deutlich geringere Toxizität auszeichnet. Auch sind im Substratpuffer, in dem das p-HPPA gelöst ist, keinerlei organische Lösungsmittel oder sonstige toxische Verbindungen enthalten. Aufgrund dieser Vorteile könnte das entwickelte Substrat auch in weiteren zukünftigen Arbeiten zur Entwicklung potentiometrischer Nachweisverfahren breiten Einsatz finden

Der in dieser Arbeit entwickelte Aflatoxin M_1 -Immunosensor hat einen Arbeitsbereich von 250 – 2000 pg mL⁻¹ Aflatoxin M_1 . Die Messung benötigt keine Probenaufarbeitung bei boviner Frischmilch bzw. haltbarer Vollmilch mit einem Fettgehalt von 0,3 – 3,8%. Die Gesamttestzeit für die Abarbeitung des Testprotokolls für den Nachweis des US-amerikanischen Grenzwertes von 500 pg mL⁻¹ Aflatoxin M_1 beträgt 10 Minuten. Neben der schnellen Testdurchführung zeichnet sich das Testprotokoll zudem durch ein Minimum von Arbeitsschritten aus.

6 Summary

Development of a potentiometric aflatoxin M₁-immunosensor using 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid as electron donating compound

This work describes the development of a potentiometric immunosensor for the detection of aflatoxin M₁ in cow milk whereby main focus was laid on the optimization of a horseradish peroxidase (HRP) electron donator suited for this test format.

The immunosensor platform, produced by screen printing, consisted of a working electrode which was coated electrochemically with polypyrrole and an Ag/AgCl electrode served as reference electrode. The working electrode was coated with a polyclonal anti-aflatoxin M₁-antibody and an aflatoxin B₁-HRP conjugate was used as labelled antigen in the direct-competitive assay format.

While optimizing the potentiometric measurement system with different phenolic compounds it turned out that methylphenols and hydroxyphenyl propionic acids (HPPA) were the most suited electron donators for HRP. In-depth experiments using isomers and derivatives of these substances revealed that the intensity of the generated signal correlates with the formation of Pummerer's type ketones. The highest signal intensities were obtained with p-HPPA. P-HPPA also shows a significantly lower toxicity compared to conventional electron donators like OPD or TMB. Furthermore, the substrate buffer in which p-HPPA was dissolved contained no organic solvents or other toxic compounds. Because of these advantages the developed substrate is suitable for a broad range of future applications of potentiometric assays.

The aflatoxin M₁-immunosensor developed in this work had a working range between 250 and 2000 pg mL⁻¹ aflatoxin M₁. Analysis of bovine pasteurized milk and UHT-milk with a fat content of 0.3 – 3.8% was possible without any sample treatment. Analysis time for the detection of aflatoxin M₁ at the US-American action limit of 500 pg mL⁻¹ was 10 min. In addition to the short test time the test protocol is also characterized by minimal hands-on time.

7 Literatur

Battacone G., Nudda A., Cannas A., Cappio Borlino A., Bomboi G., Pulina G., 2003. Excretion of Aflatoxin M₁ in Milk of Dairy Ewes Treated with Different Doses of Aflatoxin B₁. J. Dairy Sci., 86:2667-2675.

Battacone G., Nudda A., Palomba M., Pascale M., Nicolussi P., Pulina G., 2005. Transfer of Aflatoxin B₁ from Feed to Milk and from Milk to Curd and Whey in Dairy Sheep Fed Artificially Contaminated Concentrates. J. Dairy Sci., 88:3063-3069.

Busby W.F., Wogan G.N., 1984. Aflatoxins. In: Searle C.E. (Eds.), Chemical Carcinogens, 2nd Edition Vol. 2. Am. Chem. Soc., Washington, DC, pp. 945-1136.

Chen C.-Y., Li W.-J., Peng K.-Y., 2005. Determination of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Powder using High-Flow Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem., 53:8474-8480.

Diaz A.F., Kanazawa K.K., Gardini P.G., 1979. Electrochemical polymerization of pyrrole. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 14:635-646.

Dietrich R., Schneider E., Usleber E., Märtlbauer E., 1995. Use of monoclonal antibodies for the analysis of mycotoxins. Nat. Toxins, 3:288-293.

Dragacci S., Gleizes E., Fremy J.M., Candlish A.A., 1995. Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M₁ in cheeses. Food Addit. Contam., 12:59-65.

Dragacci S., Grosso F., Gilbert J., 2001. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of Aflatoxin M₁ in liquid milk: collaborative study. J. AOAC Int., 84:437-443.

EC (European Commission) 2004. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed. Request N° EFSA-Q-2003-03 5 The EFSA Journal 39:1-27; <http://www.efsa.eu.int>.

El-Nezami H.S., Nicoletti G., Neal G.E., Donohue D.C., Ahokas J.T., 1995. Aflatoxin M1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. Food Chem. Toxicol., 33:173-179.

Essigmann J.M., Croy R.G., Nadzan A.M., Busby Jr., Reinhold V.N., Büchi G., Wogan G.N., 1977. Structural identification of the major DNA adduct formed by Aflatoxin B₁ in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:1870-1874.

Funt B.L., Diaz A.F., 1991. In: Lund H., Baizer M.M. (Eds.), Organic Electrochemistry: An Introduction and a Guide, Third Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, New York, pp. 1337.

Genies E.M., Bidan G., Diaz A.F., 1983. Spectroelectrochemical study of polypyrrole films. J. Electroanal. Chem., 149:101-113.

Gourama H., Bullerman L.B., 1995. *Aspergillus flavus*: Aflatoxigenic Fungi of Concern in Foods and Feed. J. Food Prot., 58:1395-1404.

Grieshaber D., MacKenz R., Vörös J., Reimhult E., 2008. Electrochemical Biosensors – Sensor Principles and Architectures. Sensors, 8:1400-1458.

Groopman J.D., Trudel L.J., Donahue P.R., Marshak-Rothstein A., Wogan G.N., 1984. High-affinity monoclonal antibodies for aflatoxins and their application to solid-phase immunoassays. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7728-7731.

Grosso F., Fremy J.M., Bevis S., Dragacci S., 2004. Joint IDF-IUPAC-IAEA (FAO) interlaboratory validation for determining Aflatoxin M1 in milk by using immunoaffinity clean-up before thin-layer chromatography. Food Addit. Contam., 21:348-357.

Gründler P., Chemische Sensoren, Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure, Springer-Verlag, Berlin, 2004, Seite 189.

Guengerich F.P., Johnson W.W., Ueng Y.F., Yamazaki H., Shimada T., 1996. Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of Aflatoxin B₁ and relevance to risk of human liver cancer. *Environ. Health Perspect.*, 104:557-562.

Guengerich F.P., Shimada T., 1998. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat. Res.*, 400:201-213.

Guilbault G.G., Montalvo J.G., 1969. An Improved Urea Specific Enzyme Electrode. *Anal. Lett.*, 2:283-293.

Harder W.O., Chu F.S., 1979. Production and characterization of antibody against aflatoxin M₁. *Experientia*, 35:1104-1107.

Henriksen A., Schuller D.J., Meno K., Welinder K.G., Smith A.T., Gajhede M., 1998. Structural interactions between horseradish peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by X-ray crystallography. *Biochemistry.*, 37:8054-60.

Henriksen A., Smith A.T., Gajhede M., 1999. The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *J. Biol. Chem.*, 274:35005–35011.

Hewson W.D., Dunford H.B., 1976. Stoichiometry of the reaction between horseradish peroxidase and p-cresol. *J. Biol. Chem.*, 251:6043-6052.

Hewson W.D., Hager L.P., 1979. Peroxidases, catalases and chloroperoxidases. In: Dolphin D. (Eds.), *The Porphyrins*, Vol.7. Academic Press New York, pp. 295-332.

Iyer R.S., Coles B.F., Raney K.D., Thier R., Guengerich F.P., Harris T.M., 1994. DNA Adduction by the Potent Carcinogen Aflatoxin B₁: Mechanistic Studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 116:1603-1609.

Jacobson W.C., Harmeyer W.C., Wiseman H.G., 1971. Determination of aflatoxin B₁ and M₁ in milk. J. Dairy Sci., 54:21-24.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) 56, WHO Food Additives Series 47, 2001.

Ji Y., Lin G., Ye M., 1992. The establishment of rat-mouse hybridomas secreting anti-aflatoxin M₁ antibodies and the properties of their monoclonal antibodies. Chin. J. Biotechnol., 8:113-121.

Johnson W.W., Harris T.M., Guengerich F.P., 1996. Kinetics and Mechanism of Hydrolysis of Aflatoxin B₁ exo-8,9-Oxide and Rearrangement of the Dihydrodiol. J. Am. Chem. Soc., 118:8213-8220.

Johnson W.W., Guengerich F.P., 1997. Reaction of Aflatoxin B₁ exo-8,9-epoxide with DNA: Kinetic analysis of covalent binding and DNA-induced hydrolysis. Proc. Natl. Acad. Sci., 94:6121-6125.

Keskin Y., Başkaya R., Karsli S., Yurdun T., Ozyaral O., 2009. Detection of aflatoxin M₁ in human breast milk and raw cow's milk in Istanbul, Turkey. J. Food Prot., 72:885-889.

Kunzmany H., Mehring M., Roth S., 1985. Electronic Properties of Polymers and related Compounds. In: Solid State Sciences Series, Vol. 63. Springer, New York.

Li Y., Han C., Zhang J., Luo X., 2000. Establishment of monoclonal antibodies against aflatoxin M₁. Wei Sheng Yan Jiu., 29:59-60.

Ligler F.S., Taitt C.R., Optical Biosensors 2nd Edition: Today and Tomorrow, Elsevier Science, UK, 2009.

Märtlbauer E., Terplan G., 1985. Ein hochempfindlicher heterologer enzymimmunologischer Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver. Arch. Lebensmittelhyg., 36:53-55.

Magliulo M., Mirasoli M., Simoni P., Lelli R., Portanti O., Roda A., 2005. Development and validation of an ultrasensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for aflatoxin M₁ in milk. *J. Agric. Food Chem.*, 53:3300-3305.

McKinney J.D., 1972. Determination of Aflatoxin M₁ in raw milk: A modified Jacobson, Harmeyer and Wiseman method. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 49:444-445.

Micheli L., Grecco R., Badea M., Moscone D., Palleschi G., 2005. An electrochemical immunosensor for aflatoxin M₁ determination in milk using screen-printed electrodes. *Biosens. Bioelectron.*, 21:588-596.

Neal G.E., Green J.A., 1983. The requirement for glutathione S-transferase in the conjugation of activated Aflatoxin B₁ during aflatoxin hepatocarcinogenesis in rat. *Chem. Biol. Interact.*, 45:259-275.

Neal G.E., Eaton D.L., Judah D.J., Verma A., 1998. Metabolism and toxicity of aflatoxins M₁ and B₁ in human-derived in vitro systems. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 151:152-158.

Parker C.O., Lanyon Y.H., Manning M., Arrigan D.W., Tothill I.E., 2009₁. Electrochemical immunochip sensor for aflatoxin M₁ detection. *Anal. Chem.*, 81:5291-5298.

Parker C.O., Tothill I.E., 2009₂. Development of an electrochemical immunosensor for aflatoxin M₁ in milk with focus on matrix interference. *Biosens. Bioelectron.*, 24:2452-2457.

Pettersson H., Holmberg T., Larsson K., Kaspersson A., 1989. Aflatoxins in acid-treated grain in Sweden and occurrence of Aflatoxin M₁ in milk. *J. Sci. Food Agric.*, 48:411-420.

Pettersson H., 2004. Controlling mycotoxins in animal feed. In : Magan N., Olsen M. (Eds.), *Mycotoxins in food, detection and control*. CRC Press, Cambridge, England, pp. 262-304.

Pietikäinen P., Adlercreutz P., 1990. Influence of the reaction medium on the product distribution of peroxidase-catalysed oxidation of p-cresol. Appl. Microbiol. Biotechnol., 33:455-458.

Pohanka M., Skládal P., 2008. Electrochemical biosensors – principles and applications. J. Appl. Biomed., 6:57-64.

Polychronaki N., Turner P.C., Mykkänen H., Gong Y., Amra H., Abdel-Wahhab M., El-Nezami H., 2006. Determinants of Aflatoxin M1 in breast milk in a selected group of Egyptian mothers. Food Addit. Contam., 23:700-708.

Polychronaki N., West R.M., Turner P.C., Amra H., Abdel-Wahhab M., Mykkänen H., El-Nezami H., 2007. A longitudinal assessment of Aflatoxin M(1) excretion in breast milk of selected Egyptian mothers. Food Chem. Toxicol., 45:1210-1215.

Pople A.J., Beveridge D.L., 1970. Approximate molecular orbital theory. MacGraw-Hill, New York; Quantum Chemistry Program Exchange, No. 141.

Radoi A., Targa M., Prieto-Simon B., Marty J.L., 2008. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on superparamagnetic nanoparticles for aflatoxin M1 detection. Talanta., 77:138-143.

Rasooly A., Herold K.E., Biosensors and Biodetection. Humana Press, Vol. 504, 2009.

Rodriguez Velasco M.L., Calonge Delso M.M., Ordonez Escudero D., 2003. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M(1) in raw cow's milk. Food Addit. Contam., 20:276-280.

Römpf Chemie Lexikon auf CD, 9. Auflage Thieme, Stuttgart 1995.

Ronkainen N.J., Halsall H.B., Heinema W.R., 2010. Electrochemical biosensors. Chem. Soc. Rev., DOI:10.1039/b714449k.

Roth L., Frank H., Kormann K., Giftpilze Pilzgifte Schimmelpilze Mykotoxine, Nikol Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, 1990.

Sadki S., Schottland P., Brodie N., Sabouraud G., 2000. The mechanisms of pyrrole electropolymerization. Chem. Soc. Rev., 29:283-293.

Sahoo S.K., Liu W., Samuelson L., Kumar J., Cholli A.L., 2002. Biocatalytic Polymerization of p-Cresol: An in-Situ NMR Approach to Understanding the Coupling Mechanism. Macromolecules, 35:9990-9998.

Sahoo S.K., Liu W., Samuelson L., Kumar J., Cholli A.L., 2003. In-Situ NMR Spectroscopy to Understand the Mechanism of Enzymatic Polymerization of Engineering Polymeric Materials: Poly(phenols). In: Cheng H.N., English A.D. (Eds.), NMR Spectroscopy of Polymers in Solution and in the Solid State. Oxford University Press, New York, pp. 258.

Salter R., Douglas D., Tess M., Markovsky B., Saul S.J., 2006. Interlaboratory study of the Charm ROSA Safe Level Aflatoxin M1 Quantitative lateral flow test for raw bovine milk. J. AOAC Int., 89:1327-1334.

Saunders B.C., Holmes-Siedle A.G., Stark B.P., Peroxidase, Butterworths, London, 1964.

Schmeisser D., Naarmann H., Göpel W., 1993. The two-dimensional structure of polypyrrole films. Synth. Met., 59:211-221.

Scott P.M., 1989. Methods for determination of Aflatoxin M1 in milk and milk products – a review of performance characteristics. Food Addit. Contam., 6:283-305.

Sibanda L., De Saeger S., Van Peteghem C., 1999. Development of a portable field immunoassay for the detection of aflatoxin M1 in milk. Int. J. Food Microbiol., 48:203-209.

Stubblefield R.D., Shannon G.M., 1974₁. Aflatoxin M₁: Analysis in dairy production and distribution in dairy foods made from artificially contaminated milk. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 57:847-851.

Stubblefield R.D., Shannon G.M., 1974₂. Collaborative study of methods for the determination of Aflatoxin M₁ in dairy products. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 57:852-857.

Stubblefield R.D., 1979. The rapid determination of Aflatoxin M₁ in dairy products. J. Am. Oil Chem. Soc., 56:800-802.

Stubblefield R.D., van Egmond H.P., Paulsch W.E., Schuller P.L., 1980. Determination and conformation of identity of Aflatoxin M₁ in dairy products: Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63:907-921.

Stubblefield R.D., Kwolek W.F., 1986. Rapid liquid chromatographic determination of Aflatoxin M₁ and M₂ in artificially contaminated fluid milks: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69:880-885.

Thirumala-Devi K., Mayo M.A., Hall A.J., Craufurd P.Q., Wheeler T.R., Waliyar F., Subrahmanyam A., Reddy D.V., 2002. Development and application of an indirect competitive enzyme-linked immunoassay for aflatoxin M₁ in milk and milk-based confectionery. J. Agric. Food Chem., 50:933-937.

Ueng Y.-F., Shimada T., Yamazaki H., Guengerich F.P., 1995. Oxidation of Aflatoxin B₁ by bacterial recombinant human cytochrome P450 enzymes. Chem. Res. Toxicol., 8:218-225.

Ueng Y.-F., Shimada T., Yamazaki H., Guengerich F.P., 1998. Aflatoxin B₁ oxidation by human cytochrome P450s. J. Toxicol. Sci., 23:132-135.

Vadgama P., 1990. Membrane based sensors: A review. J. Membran Sci., 50:141-125.

Van Egmond H.P., 1989. Aflatoxin M₁: Occurrence, Toxicity, Regulation. In: H.P. van Egmond (Eds.), *Mycotoxins in Dairy Products*. Elsevier Applied Science, New York, pp.11-55.

Veldman A., Meijst J.A.C., Borggreve G.J., Heeres-van der Tol J.J., 1992. Carry-over of Aflatoxin from cow's food to milk. *Anim. Prod.*, 55:163-168.

Viswanathan S., Radecka H., Radecki J., 2009. Electrochemical biosensors for food analysis. *Monatsh. Chem.*, 140:891-899.

Waltman R.J., Bargon J., 1984. Reactivity/structure correlations for the electropolymerization of pyrrole: An INDO/CNDO study of the reactive sites of oligomeric radical cations. *Tetrahedron*, 40:3963-3970.

Waltman R.J., Bargon J., 1986. Electrically conducting polymers: a review of the electropolymerization reaction, of the effects of chemical structure on polymer film properties, and of applications towards technology. *Can. J. Chem.*, 64:76-95.

Wang Y., Dostálek J., Knoll W., 2009. Long range surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy for the detection of aflatoxin M₁ in milk. *Biosens. Bioelectron.*, 24:2264-2267.

Woychik N.A., Hinsdill R.D., Chu F.S., 1984. Production and characterization of monoclonal antibodies against aflatoxin M₁. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48:1096-1099.

Xu Y.-P., Huang G.-L., Yu Y.-T., 1995. Kinetics of phenolic polymerization catalyzed by peroxidase in organic media. *Biotechnol. Bioeng.*, 47:117-119.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer ganz herzlich, dass er mir diese Arbeit ermöglicht hat und für die Unterstützung während dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei der R-Biopharm AG bedanken, die mir die Materialien, Räumlichkeiten und Einrichtungen für die Durchführung meiner Arbeit bereitgestellt hat.

Bei Herrn Dr. R. Dietrich bedanke ich mich ganz besonders für die freundliche Betreuung und für seine stets freundliche Hilfsbereitschaft. Ebenso herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer bei der R-Biopharm AG Herrn Dr. W. Lübbe bedanken, dass er ohne zu zögern diese Aufgabe angenommen hat.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. P. Grundmann für die fachlichen Diskussionen über chemische Sachverhalte und die dabei erarbeiteten Lösungsansätze.

Meiner Mutter Karin Rameil und meinem verstorbenen Vater Siegfried Rameil danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung bei all meinen Plänen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Isabel Christin Rameil, die mir während den stressigen Phasen der Arbeit immer zur Seite stand. Sie hat mich tatkräftig unterstützt, sei es durch Korrekturlesen, Hilfe bei der Übersetzung meiner Veröffentlichung oder durch aufmunternde Worte.